

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Hana Váňová

VYUŽITÍ MIKRO-RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PŘI ANALÝZE VÝTVARNÝCH DĚL

Application of micro-Raman spectroscopy to analysis of
artworks

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Ivan Němec, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením Výzkumného záměru MSM 0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 28. května 2013.

.....

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá využitím mikro-Ramanovy spektroskopie při analýze výtvarných děl. Hlavním cílem práce bylo posouzení, výběr a případná optimalizace metod pro identifikaci indiga v nátěrových vrstvách výtvarných děl. Vybrané barvivo bylo studováno v různých skupenských formách s využitím sady excitačních laserů emitujících ve viditelné oblasti. Bylo také studováno reálné využití rezonančních a povrchově zesílených metod. Výsledkem práce jsou závěry týkající se vhodnosti použití jednotlivých technik Ramanovy spektroskopie pro identifikaci cílového pigmentu ve výtvarném umění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikro-Ramanova spektroskopie, povrchově zesílená Ramanova spektroskopie, rezonanční Ramanova spektroskopie, indigo, výtvarné umění

ABSTRACT

This thesis deals with the application of micro-Raman spectroscopy to analysis of artworks. The main topic of the thesis was to qualify, select and eventually optimize methods acceptable to identification of indigo dye in the paint layers of artworks. Selected dye was studied in various states using set of excitation lasers emitting in the visible region. There was also studied the real usage of resonance and surface-enhanced methods. The result of the thesis are the conclusions related with the suitability of particular techniques of Raman spectroscopy to identify the target pigment in the art.

KEYWORDS

Micro-Raman spectroscopy, surface-enhanced Raman spectroscopy, resonance Raman spectroscopy, indigo dye, artworks

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování vedoucímu své bakalářské práce, Doc. RNDr. Ivanu Němcovi, Ph.D., za veškerý věnovaný čas, cenné rady a trpělivost. Rovněž bych chtěla poděkovat svým rodičům a příteli za jejich podporu.

Obsah

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 POVRCHEM ZESÍLENÝ RAMANŮV ROZPTYL	6
2.2 KOLOIDNÍ NANOČÁSTICE	7
2.3 APLIKACE SERS PŘI ANALÝZÁCH DĚL VÝTVARNÉHO UMĚNÍ	9
2.4 INDIGO.....	10
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	14
3.2 PŘÍSTROJE.....	14
3.3 POSTUPY MĚŘENÍ	14
3.3.1 Měření Ramanových spekter.....	15
3.3.2 Měření povrchově zesílených Ramanových spekter	16
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	18
4.1 STUDIUM RAMANOVÝCH SPEKTER	18
4.2 STUDIUM POVRCHOVĚ ZESÍLENÝCH RAMANOVÝCH SPEKTER.....	23
5. ZÁVĚR	41
6. LITERATURA	42

1. Úvod

Ramanova spektroskopie se dnes řadí mezi analytické metody schopné detekovat molekuly nebo ionty i o velmi nízkých koncentracích (až piko nebo femtomoly na litr) a zároveň napomáhá definovat jejich složení a chemickou strukturu. Využití této metody je tedy velmi rozmanité. Lze ji aplikovat v chemickém průmyslu a výzkumu, ve výtvarném umění (studium barviv, pojiv, vláken textilií a laků), ve forenzní analýze (detekce drog, léků, výbušnin nebo inkoustů), v medicínské praxi, v mikrobiologii (detekce bakterií a plísní), při sekvenční analýze DNA a v mnoha dalších případech.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá využitím mikro-Ramanovy spektroskopie při analýze výtvarných děl. Hlavním předmětem zájmu byla identifikace barviva indiga. Vybrané barvivo bylo studováno v různých skupenských formách s využitím sady excitačních laserů emitujících ve viditelné oblasti. Bylo také studováno reálné využití rezonančních a povrchově-zesílených metod.

Hlavním cílem práce bylo posouzení, výběr a případná optimalizace metod pro identifikaci indiga v nátěrových vrstvách výtvarných děl.

2. Teoretická část

2.1 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl

Metody Ramanovy spektroskopie založené na klasickém Ramanově rozptylu (RS – z angl. Raman Scattering), případně rezonančním Ramanově rozptylu (RRS - z angl. Resonance Raman Scattering), jsou velmi účinným nástrojem pro analýzy děl výtvarného umění. S jejich pomocí lze úspěšně zkoumat anorganické pigmenty, organická barviva i pojiva [1,2]. Jedná se o spolehlivé, rychlé a nedestruktivní metody umožňující identifikovat velmi malá množství materiálu i měření *in situ*. Obecným problémem však je fluorescence většiny barviv nebo matric, ve kterých se nacházejí. V některých případech ji lze eliminovat výběrem vhodné excitační vlnové délky. Ne vždy je ale tento postup přínosný a poté je nutné přistoupit k použití pokročilejších technik, mezi něž patří např. metoda povrchem zesíleného Ramanova rozptylu. Díky této metodě je většinou nejen eliminován negativní vliv fluorescence, ale je také možno identifikovat látky o extrémně nízkých koncentracích.

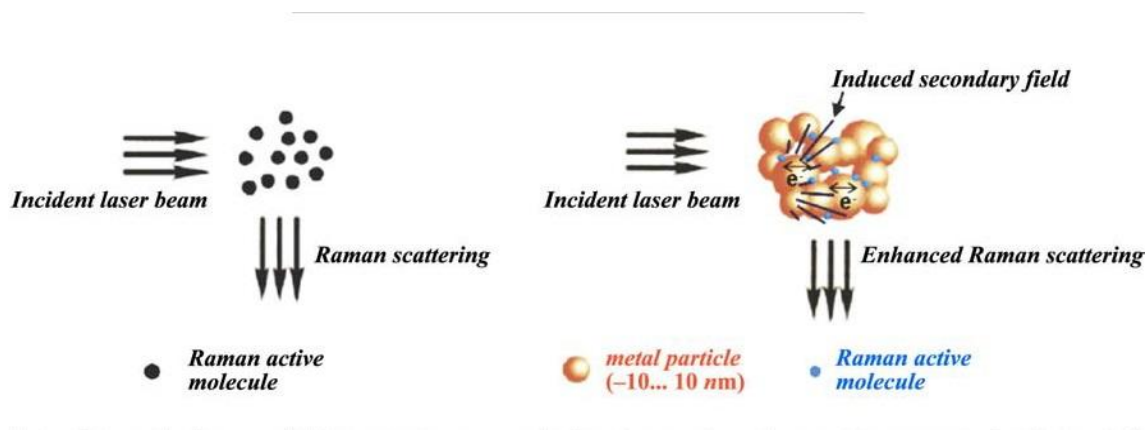
Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS - z angl. Surface-Enhanced Raman Scattering), byl poprvé pozorován v 2. polovině 70. let (1974) Fleischmannem, Hendrou a McQuillanem na stříbrné elektrodě [3], nebyl však správně interpretován. Následně v roce 1977 dvě výzkumné skupiny (Jeanmaire a Van Duyne [4] a Albrecht a Creighton [5]) nezávisle na sobě SERS „znovuobjevily“ a navrhly jeho primární teorie.

K výraznému zesílení Ramanova rozptylu dochází pomocí SERS aktivních substrátů. Ty jsou tvořeny nejčastěji zlatem, stříbrem nebo mědí, v různých formách. Zásadní roli při zesílení hraje specifická morfologie povrchu. Mezi SERS aktivní substráty patří elektrody, na kterých proběhl jeden nebo více oxidačně-redukčních cyklů. Dále pak koloidní nanočástice (nejčastěji agregované) nebo ostrůvkové filmy. Běžná míra zesílení se pohybuje v řádu 10^4 , za výjimečných podmínek až 10^{14} . Rozdíl mezi mechanismem klasické Ramanovy spektroskopie a povrchově zesílené je znázorněn na obr. 1.

V průběhu SERSu se uplatňují dva základní mechanismy - elektromagnetický a chemický [6]. Tím dominantnějším je mechanismus elektromagnetický, který přináší největší zesílení. Tento mechanismus je spojený s existencí tzv. povrchového plasmonu. Povrchovým plasmonem jsou nazývány koherentní elektronové oscilace. V okolí nanočástice tak vzniká elektrické pole, jehož intenzita je mnohonásobně vyšší než intenzita elektromagnetického pole budícího záření. Mechanismus chemický přispívá k zesílení pouze dodatečně. Přináší zesílení přibližně dvou až tří řádů. Při chemickém mechanismu je zvyšována polarizovatelnost molekuly díky její interakci s povrchem

nanočástice. Interakce probíhá na základě přenosu náboje mezi adsorbovanou molekulou a tímto povrchem.

Detekce chromoforů pomocí SERS je tedy závislá na několika faktorech. Mezi ně patří zejména optické a strukturní vlastnosti zesilujícího substrátu, afinita analytu ke kovovému povrchu, pokryv povrchu a rozsah rezonančního efektu [7].



Obr. 1 Schematické porovnání Ramanova rozptylu (vlevo) a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (vpravo) [8].

2.2 Koloidní nanočástice

Jak bylo již zmíněno výše, nanočástice kovů se řadí mezi hojně využívané SERS aktivní substráty. Nejčastěji se s nimi setkáváme ve formě koloidních disperzí.

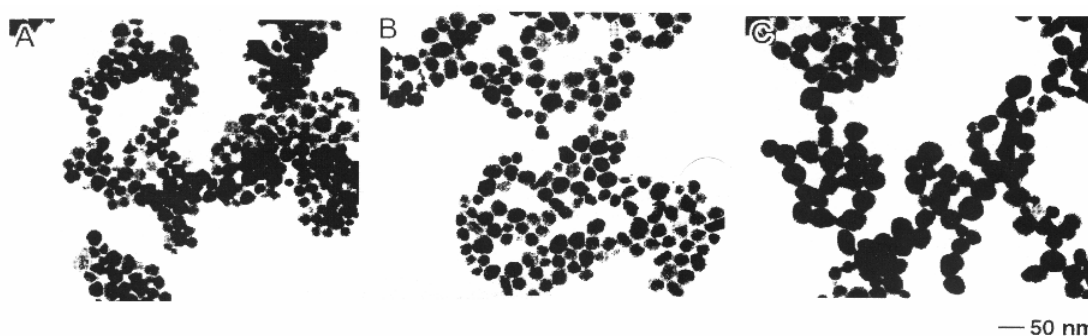
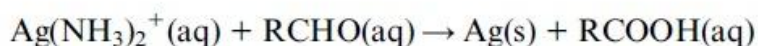
Pro tvorbu disperzí nanočástic kovů (koloidů) se v dnešní době využívá především stříbra a zlata, a to pro jejich snadnou přípravu a relativně úzký rozptyl velikosti částic. Při přípravě koloidů stříbra se můžeme setkat se dvěma základními postupy. Mezi ně patří metody kondenzační a dispergační [6]. Při kondenzačních metodách dochází ke spojování jednotlivých atomů či molekul v homogenních soustavách do větších agregátů. Tyto metody jsou hojně využívány a dají se podle způsobu přípravy koloidů rozdělit na dvě skupiny - fyzikální a chemické. Při fyzikálních přípravách je využíváno kondenzací par kovů. U příprav chemických existuje řada reakcí vedoucích k potřebnému nerozpustnému produktu. Jedná se především o reakce redukční, využívající hlavně redukce dusičnanu stříbrného nebo jiných iontových sloučenin kovů.

Při redukci rozpustných sloučenin stříbra vznikají jednotlivé atomy stříbra, které se při dostatečné síle redukčního činidla spojují do zárodků nové pevné fáze. Následně dochází k dalšímu růstu a vzniku stabilních nanočástic stříbra. Pro redukci dusičnanu

stříbrného se jako redukčního činidla nejvíce používá citrátu sodného a tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4). Redukce pomocí tetrahydridoboritanu dává vzniknout stabilním částicím o velikosti 5 - 20 nm, jejichž absorpční maximum leží okolo 420 nm. Výhodou tohoto postupu je, že změnou poměru NaBH_4 ku AgNO_3 lze ovlivňovat jejich velikost. Nevýhodou potom, že tento postup není kompatibilní se všemi systémy, kvůli adsorbovanému tetrahydridoboritanovému aniontu na povrchu nanočástic.

Redukce pomocí citrátu, jako slabšího redukčního činidla, se provádí postupem dle Lee a Meisela [9]. Velikost takto vzniklých nanočástic se pohybuje mezi 30 až 120 nm a jejich absorpční maximum se nachází kolem 400 nm. Citrátový anion zároveň vznikající nanočástice stabilizuje.

Dalším využívaným redukčním činidlem pro dusičnan stříbrný jsou redukující cukry (např. glukosa). Působením těchto dochází k redukci amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Změnou koncentrace ligandu lze ovlivňovat velikost vznikajících částic Ag v rozmezí 25 až 400 nm. Jejich velikost se dá také do určité míry ovlivnit prvotní koncentrací stříbrné soli v roztoku, pH roztoku nebo změnou teploty (viz obr. 2). Hodnota pH umožňuje řídit přípravu, protože redukční reakce probíhá v alkalické oblasti (obvykle při pH vyšším než 10). Autoři uvádějí, že jsou takto připravené nanočástice stabilní v řádu měsíců až roků [6]. Tento postup přípravy stříbrných nanočástic vychází z historické Tollensovy přípravy stříbrného zrcátka, jejíž průběh vyjadřuje rovnice [10]:



Obr. 2 TEM snímky nanočástic stříbra připravených Tollensovou metodou při různých teplotách (A) 27 °C, (B) 30 °C a (C) 35 °C. Průměrná velikost nanočástic stříbra je pak pro jednotlivé případy ~20, ~30 a ~40 nm [6].

V současné době někteří výrobci Ramanových spektrometrů dodávají i komerční soupravy pro přípravu koloidních disperzí [11], které vycházejí z posledního popsaného postupu.

Jako dalších redukčních činidel se užívá vodíku, peroxidu vodíku, kyseliny askorbové, hydrazinu, hydroxylaminu nebo EDTA [6].

Dispergační metody jsou založeny na rozptylování velkých částic disperzních soustav za tvorby částic menších, např. rozprašováním v elektrickém oblouku a laserovou ablací. Tyto metody nejsou užívány tak často jako metody kondenzační [6].

2.3 Aplikace SERS při analýzách děl výtvarného umění

Metoda SERS je vhodná při analýze materiálů ve výtvarném umění a v archeologii. Identifikace pigmentů v obrazech, rukopisech, štukách, dalších výtvarných artefaktech a v archeologických nálezech je kriticky důležitá pro pochopení historie objektu a při řešení problémů týkajících se restaurování, konzervování, datování a prisuzování uměleckých děl. Předmětem zájmu je často také identifikace produktů degradačních procesů pigmentů, které dávají nahlédnout do prostředí, kterému byla umělecká díla nebo archeologické předměty vytvořeny [12].

SERS je nepostradatelným nástrojem, překonávajícím hranice konvenční Ramanovy spektroskopie. Je efektivní zejména při analýzách organických barviv a pigmentů. Ušlechtilé kovy SERS substrátu zesilují Ramanský signál a zároveň pomáhají zhaset nežádoucí fluorescence [13].

Všechna přírodní organická barviva mají rozsáhlý π - elektronový systém nebo atomy s volnými elektronovými páry [14]. Obě tyto skutečnosti mohou vést k jejich snazší adsorpci na kovové nanočástice.

Analytické zkoumání v oblasti kulturního dědictví stále směřuje k minimálně invazivním postupům měření pro identifikaci složek organických barviv ve vzácných uměleckých dílech [15]. Tento požadavek se dnes také odráží v používaných SERS postupech. K získání SERS spektra barviva z daného historického uměleckého objektu musí být často barevné složky z objektu separovány. To obvykle vyžaduje rozsáhlé přípravy vzorku a manipulace (např. extrakci), které trvale znehodnotí původní materiál.

Aby se vyhnuli této problematické extrakci barviva, vědci začali usilovat o přímé postupy k získání SERS spekter mikroskopických vzorků [16]. Mezi ně patří např. aplikace minimálního množství nanočástic přímo na vzorek, nebo generování nanočástic in situ [17].

Zejména se SERS analýza ukázala být spolehlivou a užitečnou metodou pro analýzu červených antrachinonů (např. karmín [18,19]), žlutých flavonoidů (luteolin [17,20])

a žlutých alkaloidů (berberin [21]) v textiliích, olejomalbách a dalších výtvarných materiálech. Ačkoliv studie výtvarných objektů pomocí SERS prokázaly vysokou citlivost a selektivitu, předmětem zájmu byla zejména červená a žlutá organická barviva. Studium modrých a fialových barviv není tak rozšířené.

Identifikace barev a pigmentů je tedy velmi užitečným zdrojem informací. Původ barvených předmětů může být přibližně datován analýzou jejich pigmentů, protože některé byly používány pouze v přesně známých historických obdobích. Identifikace barviv a pigmentů může také sloužit k potvrzení pravosti nebo k přisouzení díla k autorovi a době. Může poskytnout informace týkající se technických znalostí určité populace v daném historickém období nebo o původu textilního materiálu.

2.4 Indigo

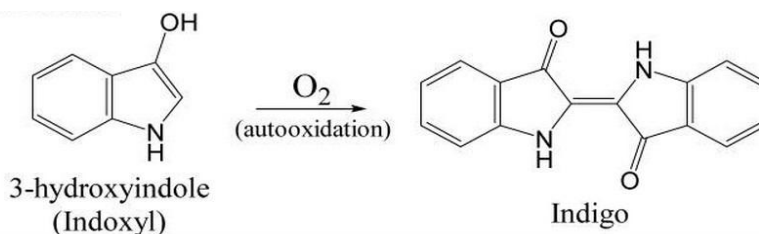
Indigo je ceněným barvivem již od starověku. Je známé nejen svou nádhernou barvou, ale i nevšední stabilitou. Bylo významným ekonomickým artiklem, protože modrá přírodní barviva byla vzácná.

Tento pigment zdobil v historii například pohřební šatstvo ve starověkém Egyptě (již v 16. století př. n. l. a možná i dříve) [22]. Běžně se s ním můžeme setkat v olejomalbách nebo štukaturách. Často tvořilo barevné směsi, například se žlutou barvou pro získání zelené. Dnes je součástí našeho každodenního života jako modrá barva denimu, i když ne již ve své původní formě. Od konce 19. století je syntetizováno uměle. O to se zasloužili Baeyer a Drewson, kteří připravili indigo z 2-nitrobenzaldehydu [23].

Indigo je také známé jako chromofor Mayské modři - pigmentu obsahujícího kromě indiga také minerál palygorskit (výskyt v jílovitých horninách). Tento minerál způsobuje velkou odolnost pigmentu po tisíce let bez známky degradace a ztráty vlastností. Mayskou modř používali obyvatelé Mexika v předkolumbovské době na zdobené keramiky a nástěnných maleb [24].

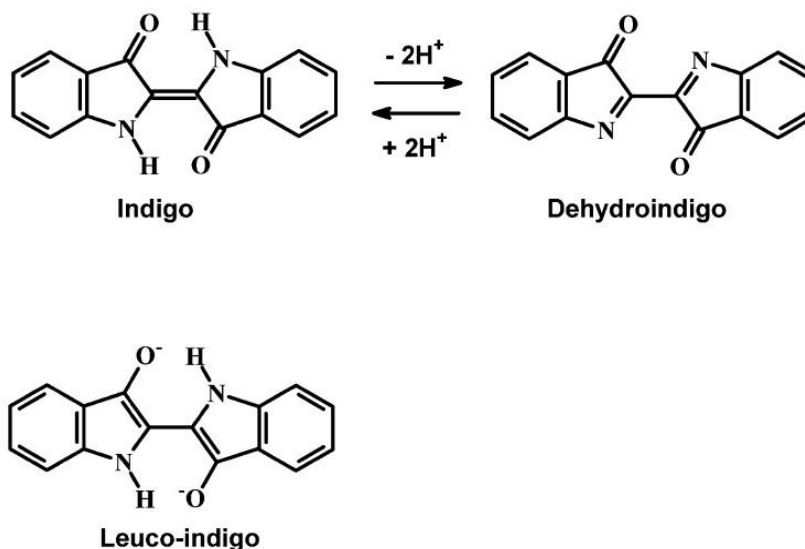
Původ indiga je lokalizován do starověké Indie, odkud bylo dováženo do Evropy. Spojení indiga s Indií je zřejmé i z názvu barviva (dříve indicum nebo indicon). V Indii se získávalo výluhem z rostliny *Indigofera tinctoria* (indigovník barvířský), jež poskytuje velké množství indiga. V Evropě se menší množství získávala z rostliny *Isatis tinctoria* (boryt barvířský), avšak velká množství byla stále dovážena z Indie.

Tyto rostliny obsahují glukosid nazývaný indican. Enzymatická hydrolýza glukózového zbytku produkuje indoxyl, který spontánně dimerizuje a oxiduje se na vzduchu a vzniká indigo (viz obr. 3).



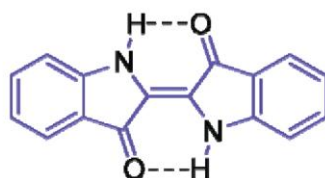
V plynné fázi se indigo vyskytuje jako monomer s planárním uspořádáním molekuly

Indigo bylo studováno pomocí mnoha rozmanitých analytických metod. Jen některé



Obr. 4 Konverze mezi neutrálním indigem a jeho oxidovanou formou dehydroindigem a struktura leuko formy indiga [34].

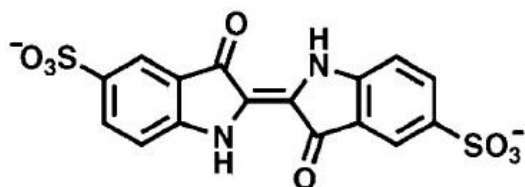
Obzvlášť těžké je detekovat indigo ve vrstvách historických maleb, protože je barvivo náchylné k fluorescenci a často se objevuje ve směsích s ostatními pigmenty. Vzhledem ke své nerozpustnosti ve vodě poskytuje indigo slabý SERS signál na koloidním stříbre ve vodném roztoku. Je proto prospěšné upravit vzorek pomocí solí nebo kyselin. Toho lze dosáhnout např. pomocí kyseliny sírové přeměňující nerozpustné indigo na rozpustné modrozelené sulfonované indigo (indigo karmín) - viz obr. 6 [7].



Obr. 5 Struktura indiga s vodíkovými vazbami mezi keto a aminoskupinami [28].

Jak již bylo výše zmíněno, indigo je jedním z modrých pigmentů, který byl a je intenzivně studován metodami Ramanovy spektroskopie [35-38]. Hlavní pozornost byla zaměřena nejen na SERS metody [7,38,39], ale díky absorpčním pásům indiga při cca 600 nm a sulfonovaného indiga při cca 430 nm byly diskutovány také metody identifikace vycházející z RRS a SERRS (SERRS - z angl. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering) procesů [38-41] při použití excitace ve viditelné oblasti.

Nicméně byl tento pigment studován jen v omezeném rozsahu excitačních vlnových délek (maximálně pro dvojici) a stříbrný koloid používaný v povrchově zesílených měřeních byl výhradně připravován redukcí dusičnanu sodného citrátem.



Obr. 6 Struktura molekuly sulfonovaného indiga [7].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Indigo - $C_{16}H_{10}N_2O_2$ (Lachema, ČR)

N,N-dimethylformamid - C_3H_7NO (Lachema, ČR)

Methanol - CH_3OH čistota 99,9 % (Roth, Německo)

kyselina sírová - H_2SO_4 , čistota 96% (Lachner, ČR)

souprava pro přípravu disperze koloidních nanočástic - NicCOLLOIDSilver (Nicolet CZ, ČR)

3.2 Přístroje

- Mikro-Ramanův spektrometr DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) vybavený excitačními lasery 445 nm, 532 nm, 633 nm (přesně 632,8 nm) a 780 nm. Spektrometr byl před měřením vždy kalibrován softwarově řízeným procesem ovládacího programu Omnic [42].
- UV/VIS spektrofotometr Cary 4000, firma Agilent Technologies, USA
- stolní centrifuga EBA 21, firma Hettich, Německo

3.3 Postupy měření

Spektra pevných vzorků byla získána pomocí objektivu se zvětšením 50x. Spektra roztoků pomocí objektivu se zvětšením 4x. Jako nejvhodnější nastavení podmínek měření se ukázala doba ozařování excitačním laserem 2 s a počet expozic 64. Byla použita mřížka „Full-range“ - rozsah 50 - 3500 cm^{-1} a spektrální rozlišení $\leq 5 cm^{-1}$. Výkon excitačního laseru 445 nm se pohyboval v rozmezí 0,5 - 8 mW pro pevné vzorky a 3,5 - 5,5 mW pro roztoky. Výkon excitačního laseru 532 nm se pohyboval v rozmezí 1 - 8 mW pro pevné vzorky a v rozmezí 1 - 10 mW pro roztoky. Výkon excitačního laseru 633 nm se pohyboval od 0,5 - 4 mW pro pevné vzorky a od 3 - 6 mW pro roztoky. Výkon laseru 780 nm se pohyboval v rozmezí 10 - 18 mW pro pevné vzorky. Pro roztoky byl použit výkon 10 mW. Zpracování spekter bylo prováděno pomocí softwaru OMNIC.

3.3.1 Měření Ramanových spekter

Měření čistého práškového indiga

Malé množství práškového indiga jsem nanesla na sklíčko a rozetřela kopistkou. Signál jsem změřila ze zrna indiga pomocí Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření modelové nátěrové vrstvy

Na modelové nátěrové vrstvě [43] (1% koncentrace indiga) jsem vybrala tmavé zrno, které jsem proměřila Ramanovým spektrometrem. Měření jsem provedla při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření roztoku indiga v methanolu

Přidáním methanolu k malému množství práškového indiga jsem připravila jeho nasycený roztok (slabě namodralý). Ten jsem změřila ve skleněné mikrozkušavce pomocí Ramanova spektrometru při excitační vlnové délce 532 nm.

Měření roztoku indiga v N,N-dimethylformamidu

Do mikrozkušavky Eppendorf jsem odvážíla 0,0017 g práškového indiga o molekulové hmotnosti 262, 26 g·mol⁻¹. Zkušavku jsem doplnila 1000 µl N,N-dimethylformamidu a roztok jsem dobře promíchala. Takto připravený roztok jsem postupně ředila až do koncentrace 8·10⁻⁴ mol·dm⁻³ a 4·10⁻⁴ mol·dm⁻³. Původní roztok i roztoky zředěné jsem proměřila ve skleněné mikrozkušavce Ramanovým spektrometrem při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření indiga po přidání kyseliny sírové

Na sklíčko jsem nanesla malé množství práškového indiga. Poté jsem na vzorek na sklíčko kápala koncentrovanou kyselinu sírovou a nechala 45 min. reagovat (tento postup vychází z publikace [7]). Po uplynutí 45 min. doby jsem změřila zrno indiga pomocí Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření mikro vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy a extrahovaného N,N-dimethylformamidem

Z modelové nátěrové vrstvy (1% koncentrace indiga) jsem odebrala část vzorku do malé uzavíratelné kádinky. Přidala jsem takový objem N,N-dimethylformamidu, aby zabarvení roztoku přibližně odpovídalo roztoku o koncentraci 8·10⁻⁴ mol·dm⁻³. Poté

jsem kádinku uzavřela a nechala indigo extrahovat 4 dny. Po této době jsem roztok proměřila při 532 nm a 633 nm.

Měření indiga ve vzorku odebraném z modelové nátěrové vrstvy po přidání kyseliny sírové

Z modelového vzorku (1% koncentrace indiga) jsem odškrábala část vzorku na sklíčko. Dále jsem na sklíčko se vzorkem kápala konc. kyselinu sírovou a nechala 45 min. reagovat. Poté jsem změřila nalezené zrno indiga při excitační vlnové délce 532 nm.

3.3.2 Měření povrchově zesílených Ramanových spekter

Studium stability disperze stříbrných nanočástic

Připravila jsem disperzi stříbrných nanočástic (dále jen „Ag-disperze“) použitím sady NicCOLLOIDSilver dle přiloženého návodu. A to smícháním 450 μ l roztoku 1 (stříbrný koloid) a roztoku 2 (aktivátor) v mikrozkuhavce Eppendorf. Poté jsem roztoky míchala po dobu 10 s a následně mikrozkuhavku otevřela a nechala stát 3 min. Po 3 min. jsem mikrozkuhavku zavřela, míchala roztok 5 min., znovu mikrozkuhavku otevřela a nechala stát 6 min. Tento roztok jsem poté proměřila na UV-Vis spektrometru s rozlišením 1 nm ve spektrálním rozsahu 355 nm až 850 nm. Měření jsem prováděla po 2 minutách během jedné hodiny.

Měření čistého práškového indiga

Malé množství práškového indiga jsem nanesla na sklíčko a rozetřela kopístkou. Na vzorek jsem dále přidala kapku Ag-disperze připravené dle návodu uvedeného výše a vzorek jsem proměřila Ramanovým spektrometrem. Měření jsem prováděla při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření modelové nátěrové vrstvy

Dle návodu popsaného výše jsem připravila Ag-disperzi, kterou jsem nanesla na modelovou nátěrovou vrstvu. Tento vzorek jsem dále měřila pomocí Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření indiga v roztoku N,N-dimethylformamidu

Připravila jsem Ag-disperzi dle výše popsaného návodu, s tím rozdílem, že jsem po smíchání roztoků 1 a 2 přidala do mikrozkuhavky také 50 μ l roztoku indiga v N,N-dimethylformamidu. Měření jsem prováděla ve skleněné mikrozkuhavce při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření indiga v roztoku methanolu

Dle výše popsaného postupu jsem připravila Ag-disperzi. Roztok indiga v methanolu jsem opět přidala hned po smíchání roztoků 1 a 2. Následovalo měření ve skleněné zkumavce pomocí Ramanova spektrometru při 532 nm.

Měření indiga po přidání kyseliny sírové

Připravila jsem Ag-disperzi dle dříve popsaného postupu. Tuto Ag-disperzi jsem odstředila na stolní centrifuze dvakrát po dobu 5 min. a 5000 otáčkách za minutu. Ze spodní zakoncentrované části jsem odebrala 10 μ l a tento objem kápala na sklíčko mimo vzorek. Následně jsem část objemu přenesla na celou plochu vzorku indiga s kyselinou sírovou. Potom jsem měřila signál na shluk stříbrných částic pomocí Ramanova spektrometru. Měření jsem prováděla při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm.

Měření mikro vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy a extrahovaného N,N-dimethylformamidem

K Ag-disperzi připravené dle návodu zmiňovaného výše jsem přidala 50 μ l roztoku indiga z modelové nátěrové vrstvy v N,N-dimethylformamidu připraveného dle postupu uvedeného výše. Tento roztok jsem změřila ve skleněné mikrozkuhavce Ramanovým spektrometrem při excitačních vlnových délkách 532 nm a 633 nm.

Měření indiga ve vzorku odebraném z modelové nátěrové vrstvy po přidání kyseliny sírové

Připravila jsem Ag-disperzi dle návodu uvedeného výše. Disperzi stříbrných nanočástic jsem dále centrifugovala na stolní centrifuze při 5000 otáčkách za minutu dvakrát po dobu 5 min. Ze spodní zakoncentrované části jsem odebrala 10 μ l a tento objem kápala na sklíčko mimo vzorek. Následně jsem část objemu přenesla na celou plochu vzorku s kyselinou sírovou a proměřila shluk nanočástic při 532 nm.

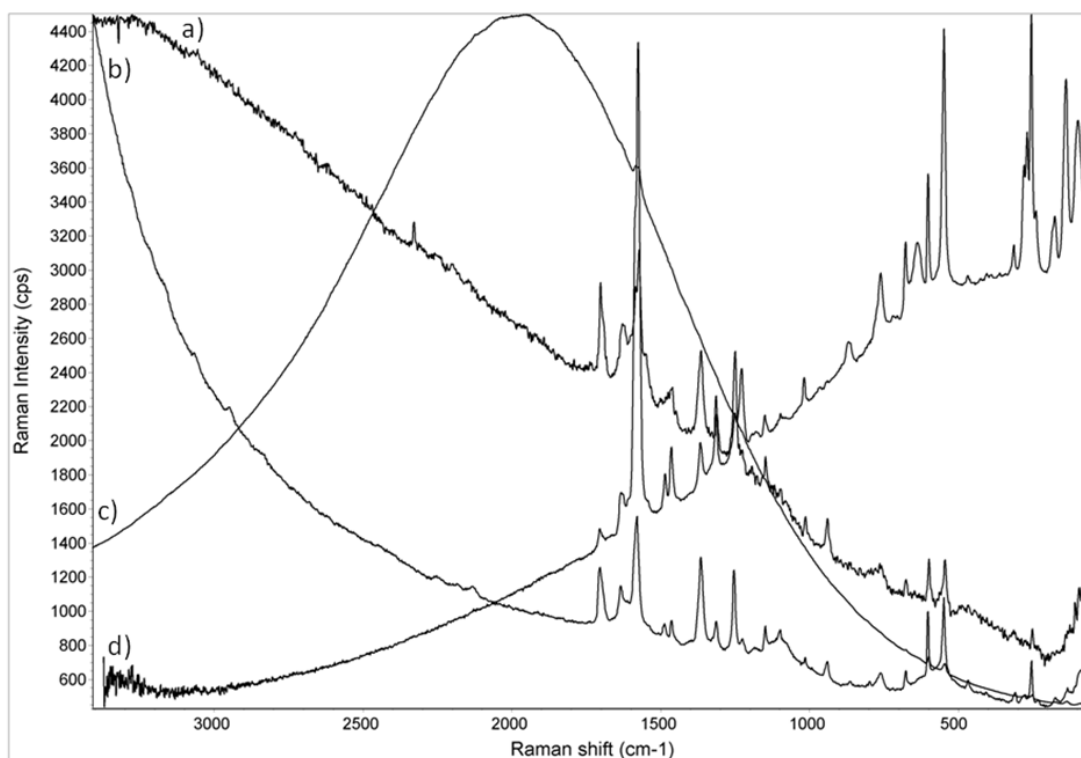
4. Výsledky a diskuze

4.1 Studium Ramanových spekter

Pomocí mikro-Ramanova spektrometru byla studována spektra čistého práškového indiga, indiga v modelové nátěrové vrstvě a indiga v roztoku.

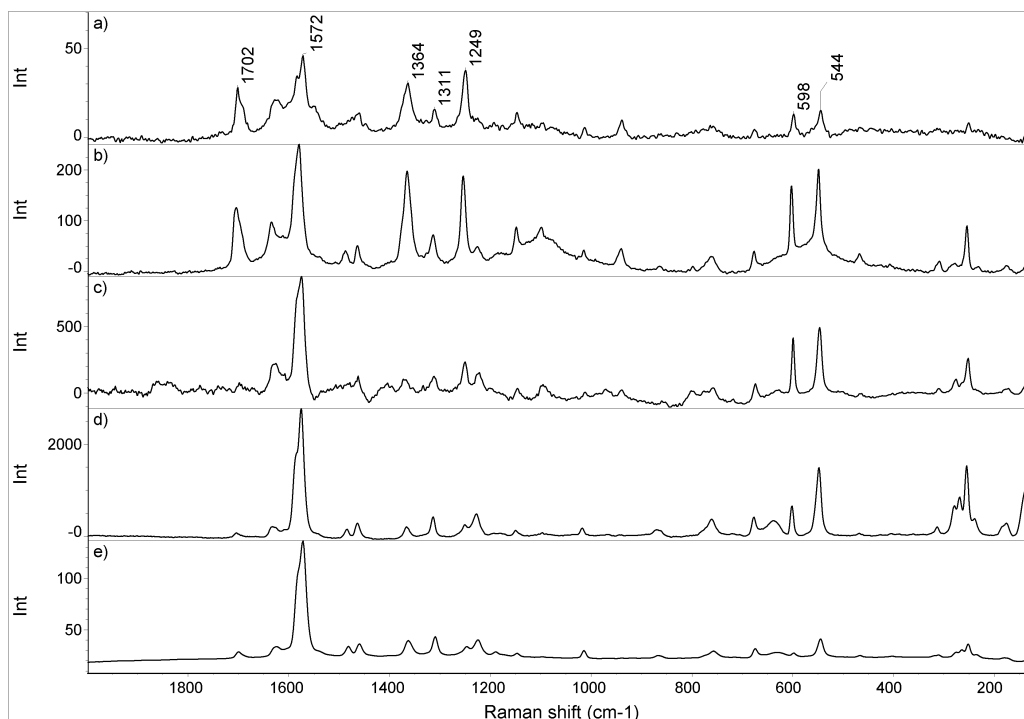
Měření čistého práškového indiga

Nejprve jsem proměřila čisté práškové indigo, postupně při čtyřech excitačních vlnových délkách (obr. 7). Získaná spektra byla dále využívána pro porovnávání spektrálních projevů dalších vzorků. Z obrázku je patrné, že se spektra při různých excitačních vlnových délkách liší tvarem základní linie. Při excitaci 445 nm a 532 nm pozadí spekter klesá od vyšších vlnočtů k nižším. Při excitaci 633 nm bylo získané rezonanční Ramanovo spektrum indiga komplikováno fluorescencí, která překrývá téměř všechny jeho spektrální projevy. Při excitační vlnové délce 780 nm naopak pozadí spektra směrem k nižším vlnočtům stoupá. V tomto obrázku je také možné sledovat rozdíly v intenzitách jednotlivých pásů indiga při těchto excitačních vlnových délkách.



Obr. 7 Porovnání Ramanových (RS, RRS) spekter čistého práškového indiga při čtyřech excitačních vlnových délkách a) excitace 445 nm b) excitace 532nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm.

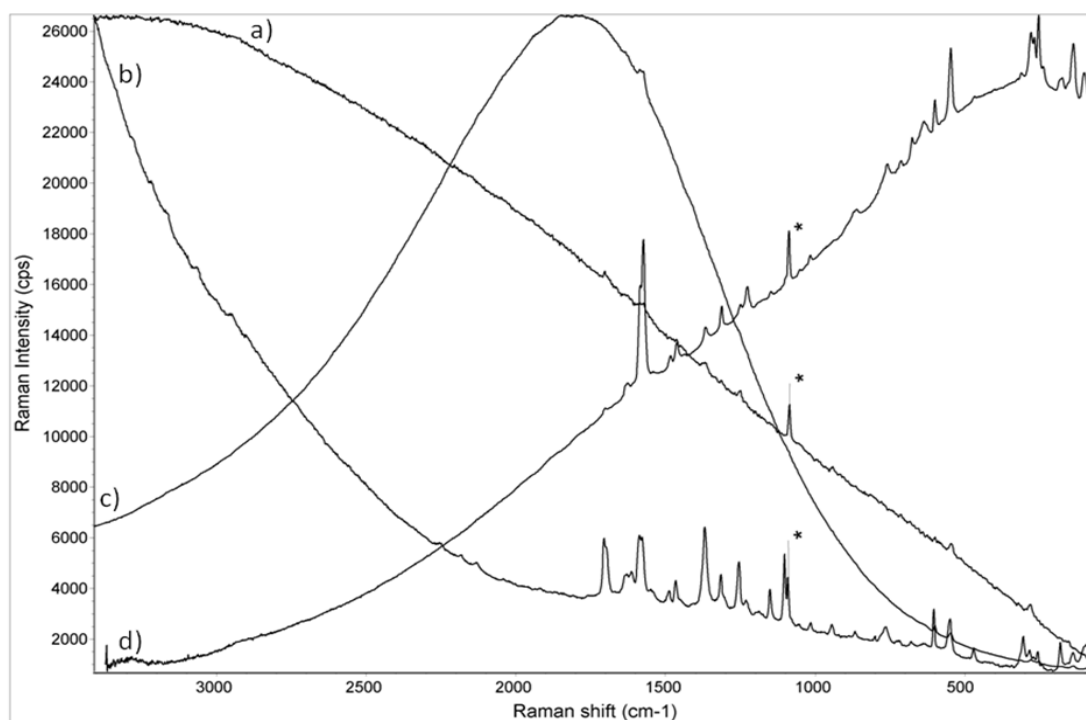
Rozdíly v intenzitách Ramanových pásů indiga v závislosti na excitační vlnové délce jsou dobře patrný na obr. 8, kde bylo softwarově upraveno pozadí. Do obrázku bylo přidáno již dříve změřené FT-Ramanovo spektrum (excitace při 1064 nm). Vlnočty hlavních pásů indiga jsou pro názornost odečteny u spektra excitovaného laserem 445 nm. Z obrázku je zřejmé, že se relativní intenzity charakteristických pásů mění v závislosti na použité excitační vlnové délce. Při excitaci 445 nm jsou intenzity těchto pásů vyrovnané. S rostoucí excitační vlnovou délkou až do excitace 780 nm dochází k nárůstu intenzity pásu při 1572 cm^{-1} , který je ze všech pásů nejintenzivnější. U ostatních pásů v oblasti vlnočtů 1200 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} a v oblasti 500 cm^{-1} až 600 cm^{-1} dochází s rostoucí excitační vlnovou délkou od excitace 532 nm ke změnám relativních intenzit. Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že s rostoucí excitační vlnovou délkou se mění počet pásů vhodných k primární identifikaci indiga. Pro detailní popis spekter bylo následně provedeno odečtení všech pásů indiga, které je uvedeno v tab. 1. Výše popsaná naměřená Ramanova spektra indiga se shodují se spektry již dříve publikovanými [37,44,45]. Detailní přiřazení pásů indiga je publikováno například v pracích [46,47]. Je ovšem opět nutné zdůraznit, že v žádné z nich nebyly spektrální projevy indiga studovány v takovém rozsahu excitačních vlnových délek jako v této bakalářské práci.



Obr. 8 Porovnání relativních intenzit pásů čistého práškového indiga při pěti excitačních vlnových délkách a odečtení nejdůležitějších pásů (excitace 445 nm). a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm e) excitace 1064 nm. Pozadí bylo softwarově upraveno.

Měření modelové nátěrové vrstvy

Dále bylo přistoupeno k měření modrého zrna indiga v modelové nátěrové vrstvě (1% koncentrace indiga) při čtyřech excitačních vlnových délkách. Z obr. 9 vyplývá, že celkové tendence základní linie získaných spekter jsou srovnatelné se spektry čistého práškového indiga. Pás při 1086 cm^{-1} (označený u obr. 9) je projevem přítomnosti uhličitanu vápenatého, který je součástí matrice nátěrové vrstvy. V tomto obrázku jsou opět patrné rozdíly v intenzitách pásů mezi jednotlivými excitačními vlnovými délkami. Pásky indiga jsou ve spektru při excitaci 445 nm hůře viditelné. Záznam s excitační vlnovou délkou 633 nm opět komplikuje fluorescence.



Obr. 9 Porovnání Ramanových (RS, RRS) spekter zrn indiga v modelové nátěrové vrstvě při čtyřech excitačních vlnových délkách a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm. Pás označený hvězdičkou patří uhličitanu vápenatému.

Následně bylo pokračováno měřením Ramanových spekter roztoků indiga v methanolu a v N,N-dimethylformamidu.

Tabulka 1 Pozorovaná maxima v Ramanových (RS, RRS) spektrech čistého indiga při různých excitačních vlnových délkách.

Vlnová délka excitačního laseru				
445 nm	532 nm	633 nm	780 nm	1064 nm
	88 w		98 m	
	131 w		138 s	
	174 w		176 m	
250 w	254 m	252 m	254 s 268 m	252 m
		276 w		
	309 w	311 w	313 w	
	468 w			
544 m	548 s	546 s	548 s	545 s
598 m	602 s	599 s	601 m	598 w
			639 m	
676 w	677 w	674 m	677 m	674 m
758 w		758 m		757 m
764 w	762 w		761 m	
		801 m		
			870 w	867 w
939 m	940 w	937 w 971 w		
1013 w	1015 w	1012 w	1018 w	1014 m
1095 w	1099 m	1096 m		
1147 m	1148 m	1147 w	1150 w	1147 w
1193 w				1190 w
	1226 w	1222 m	1228 m	1225 s
1249 s	1254 s	1250 m	1250 m	1248 m
1311 m	1314 m	1312 m	1314 m	1310 s
1364 s	1365 s		1367 m	1363 s
		1373 m		
		1402 w		
1460 m	1464 w	1463 m	1464 m	1460 m
	1488 w		1485 w	1482 m
1572 vs	1580 vs	1575 vs	1576 vs	1572 vs
1583 s				
1628 s		1626 m		1625 m
	1635 m		1634 w	
1702 s	1705 s	1699 w	1705 w	1700 m

Měření roztoku indiga v methanolu

Měření roztoku indiga v methanolu bylo provedeno při excitaci 532 nm. V tomto případě se kvůli omezené rozpustnosti pigmentu bez dalšího zesílení indigo nepodařilo

změřit. Ve spektru (viz diskuze na str. 28) nebyly patrné žádné pásy kromě pásů rozpouštědla.

I když existuje mnoho literárních prací, ve kterých byl methanol používán jako vhodné rozpouštědlo pro indigo [7,20], v našem případě bylo od dalších měření s tímto rozpouštědlem upuštěno.

Měření roztoku indiga v N,N-dimethylformamidu

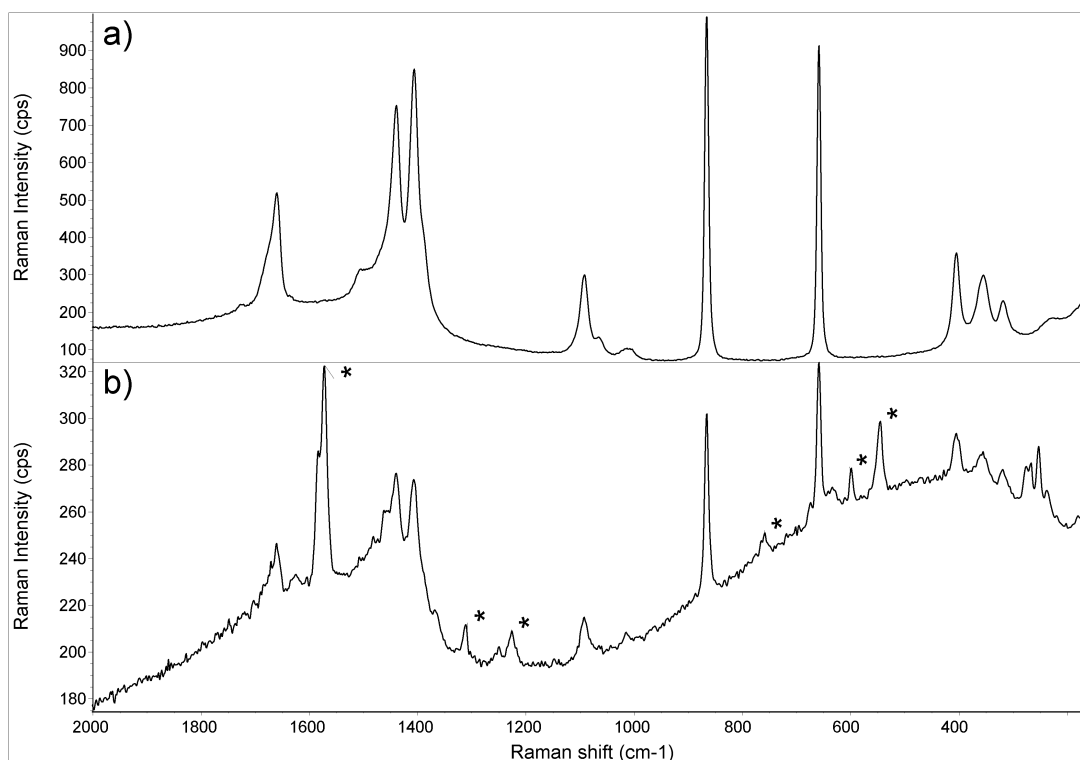
Dalším použitým rozpouštědlem byl N,N-dimethylformamid, ve kterém je indigo, jako v jednom z mála rozpouštědel, dobře rozpustné. Měření roztoků v N,N-dimethylformamidu bylo započato roztokem o nejvyšší koncentraci ($6,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) - viz obr. 10. Z obrázku je patrné, že při této koncentraci jsou pásy indiga detekovatelné a odpovídají pásům indiga v pevné fázi. Poté bylo přistoupeno k analýze roztoků indiga v N,N-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V roztoku této koncentrace bylo možné indigo identifikovat při excitační vlnové délce 532 nm díky pásu při 1581 cm^{-1} a při excitaci 780 nm díky pásu při 1572 cm^{-1} . Při měření s excitační vlnovou délkou 445 nm bylo možné rozeznat pouze rozpouštědlo. Záznam s excitační vlnovou délkou 633 nm komplikovala fluorescence.

Z výše popsanych výsledků je zjevné, že pomocí mikro-Ramanova spektrometru lze bez problémů získat kvalitní spektra práškového indiga. Je ovšem také zjevné, že kvalita těchto spekter velmi záleží na výběru vhodné excitační vlnové délky.

Dobrých výsledků bylo dosaženo také při studiu indiga v modelové nátěrové vrstvě, a to zejména díky vysoké prostorové rozlišovací schopnosti použitého spektrometru. Na základě toho lze indigo identifikovat i v materiálu, ve které se vyskytuje v nízké koncentraci. Kvalita naměřených spekter je opět závislá na excitační vlnové délce použitého laseru.

Měření provedená v roztocích indiga v N,N-dimethylformamidu byla také úspěšná. Při dvou excitačních vlnových délkách (532 nm a 780 nm) bylo možné indigo detekovat ještě při koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V roztoku indiga v methanolu se kvůli nedostatečné rozpustnosti indiga nepodařilo tento pigment identifikovat.



Obr. 10 Ramanovo spektrum indiga v roztoku *N,N*-dimethylformamidu (excitace při 780 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum indiga v roztoku *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci indiga $6,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pásky s hvězdičkou označují indigo.

4.2 Studium povrchově zesílených Ramanových spekter

Po ukončení prvotních měření bez povrchového zesílení byla další měření prováděna s přidavkem Ag-disperze získané pomocí sady NicCOLLOIDSilver.

Studium stability Ag-disperze

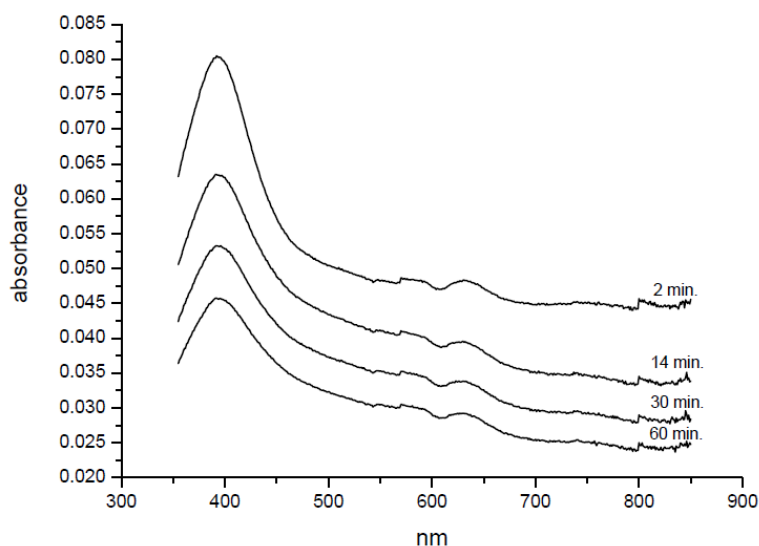
Nejprve bylo nutné ověřit, zda se velikost stříbrných částic použitého systému nemění v čase. Proto byla studována absorpční spektra Ag-disperze v závislosti na čase (viz obr. 11). Z tohoto obrázku je zřejmé, že se velikost stříbrných částic s časem nemění (absorpční maximum při 400 nm se neposunuje).

*Měření roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu*

Protože předchozí měření v roztocích *N,N*-dimethylformamidu proběhla úspěšně, první měření po aplikaci Ag-disperze byla provedena právě v těchto roztocích. Při koncentraci roztoku $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo ještě možné indigo při některých excitačních vlnových délkách detekovat, proto byla tato koncentrace zvolena pro následná povrchově zesílená měření. V SERS spektru získaném při excitaci vlnovou délkou

445 nm (obr. 12) došlo jen k minimálnímu zesílení záznamu v oblasti vlnočtů 1520 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} .

Při použití excitační vlnové délky 532 nm (obr. 13) se i bez zesílení objevují náznaky přítomnosti indiga v oblasti kolem 1550 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} a 550 cm^{-1} . Po aplikaci Ag-disperze je zřejmé, že pásy rozpouštědla byly překryty zesílenými pásy indiga. Zesílení je patrné zejména v oblasti 1150 cm^{-1} až 1750 cm^{-1} , ale i v oblasti 550 cm^{-1} až 620 cm^{-1} . Je zde také zřejmý pozitivní vliv Ag-disperze na průběh základní linie.

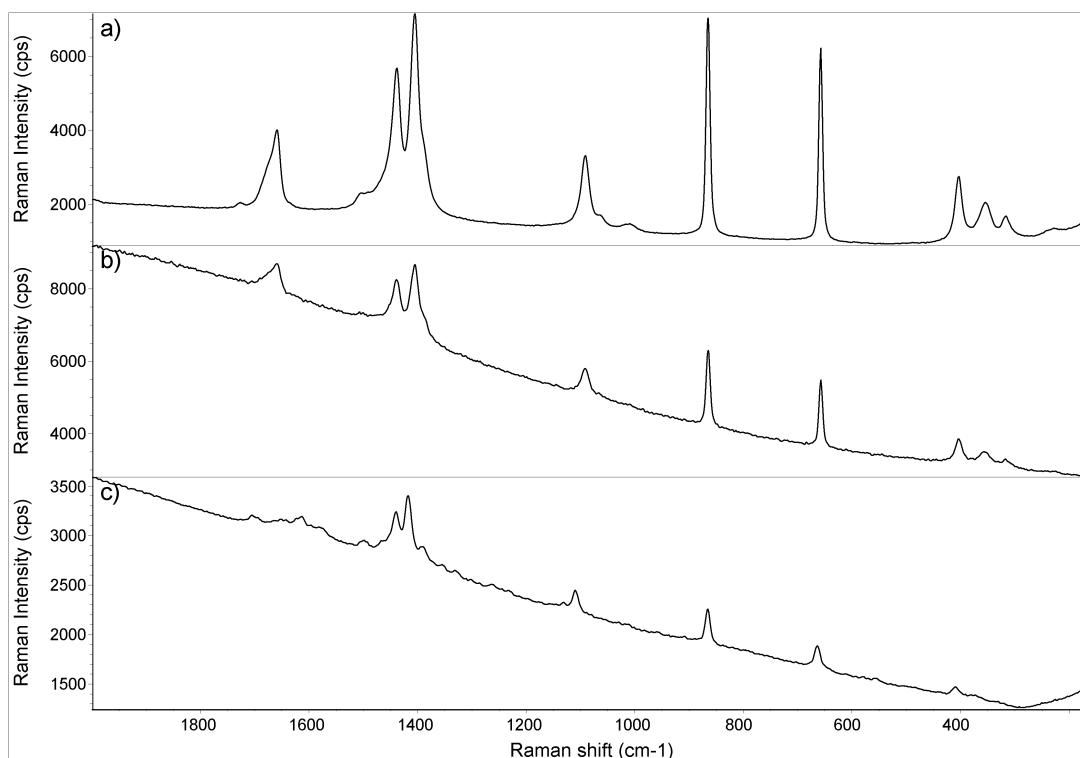


Obr. 11 Absorpční spektrum Ag-disperze měřené v časovém rozpětí jedné hodiny.

Protože indigo v roztoku o koncentraci $8,0 \cdot 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo bez problémů identifikováno, další SERS měření s excitací 532 nm bylo provedeno s roztokem s poloviční koncentrací ($4 \cdot 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). I při této koncentraci jsou pásy indiga evidentní (obr. 14).

Při excitaci s vlnovou délkou 633 nm (obr. 15) je po aplikaci Ag-disperze v SERRS spektru viditelné potlačení fluorescence a objevuje se silný pás indiga při 1622 cm^{-1} a slabé pásy v oblasti vlnočtů 1150 cm^{-1} až 1350 cm^{-1} a 440 cm^{-1} až 550 cm^{-1} .

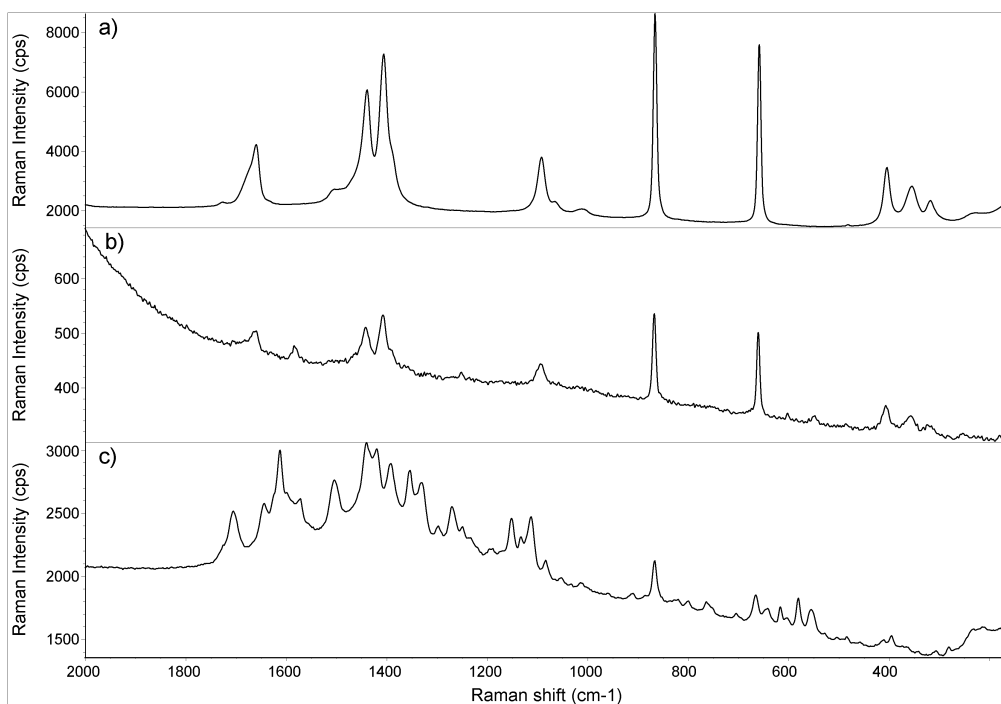
Při excitační vlnové délce 780 nm signál indiga po zesílení pomocí Ag-disperze značně vzrostl (obr. 16). V oblasti 1200 cm^{-1} až 1600 cm^{-1} se objevilo velké množství pásů, které před zesílením nebyly zaznamenány. Také při této excitační vlnové délce bylo provedeno úspěšné měření i s nižší koncentrací indiga v roztoku ($4 \cdot 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) viz obr. 17. Z tohoto obrázku je patrné, že před zesílením nebylo možné indigo identifikovat a po aplikaci Ag-disperze se objevily pásy indiga v oblasti 1150 cm^{-1} až 1620 cm^{-1} , 700 cm^{-1} až 820 cm^{-1} a pás při 550 cm^{-1} . Rozdíly v intenzitách Ramanových pásů indiga v závislosti na excitační vlnové délce jsou dobře patrné na



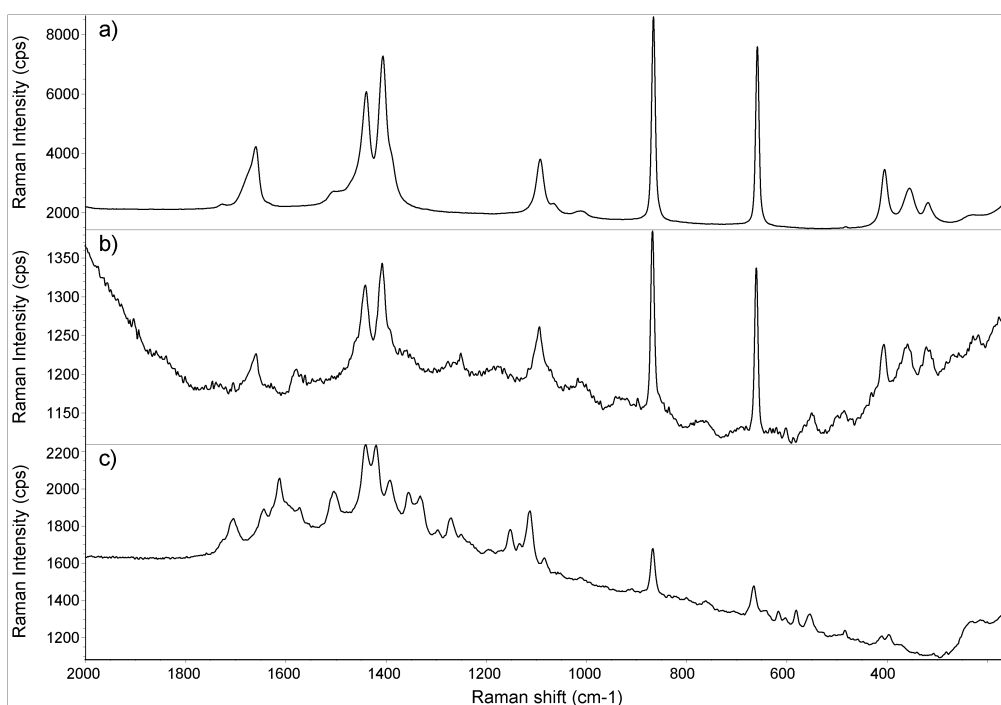
Obr. 12 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 445 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.

obr. 18. Z obrázku je zřejmé, že po zesílení se ve spektrech v oblasti 1150 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} objeví velké množství pásů. Při excitaci 445 nm není efekt povrchového zesílení tak markantní - převažují zde stále pásy rozpouštědla. Při excitaci 532 nm a 780 nm dochází k zesílení všech pásů v oblasti 1150 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} , pásy rozpouštědla je ještě možné zaznamenat. Spektrum získané při excitaci 633 nm se výrazně odlišuje od ostatních, zesílení bylo při této excitaci největší díky uplatnění SERRS efektu. Přednostně zde byl zesílen pás při 1625 cm^{-1} . Pro úplnost bylo provedeno podrobné odečtení pásů ze všech povrchově zesílených měření (tab. 2).

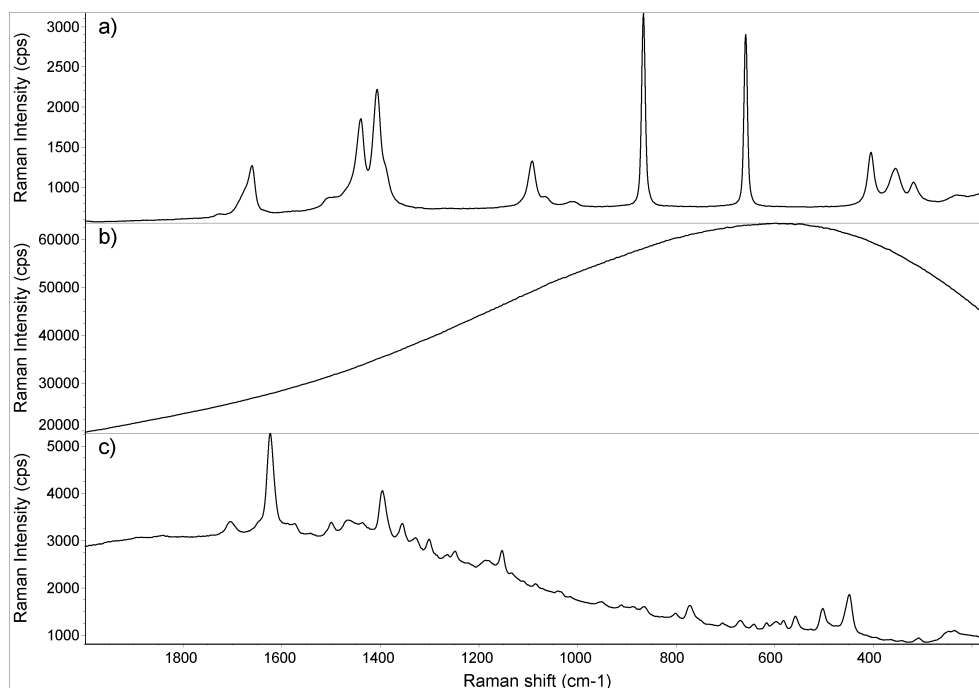
Povrchem zesílená Ramanova spektra indiga (s použitím Ag koloidu získaného redukcí pomocí citrátu) v roztoku byla publikována již dříve - např. v publikacích [20] a [27]. Nicméně intenzity pozorovaných pásů, ale v řadě případů i jejich pozice, se neshodují s našimi záznamy. Vysvětlením tohoto překvapivého jevu jsou pravděpodobně rozdíly ve způsobu přípravy stříbrného koloidu. Rozdíly v koloidním systému a typu agregačních činidel mohou zásadně ovlivňovat interakci indiga s Ag-disperzí a tím i jeho SERS/SERRS projevy.



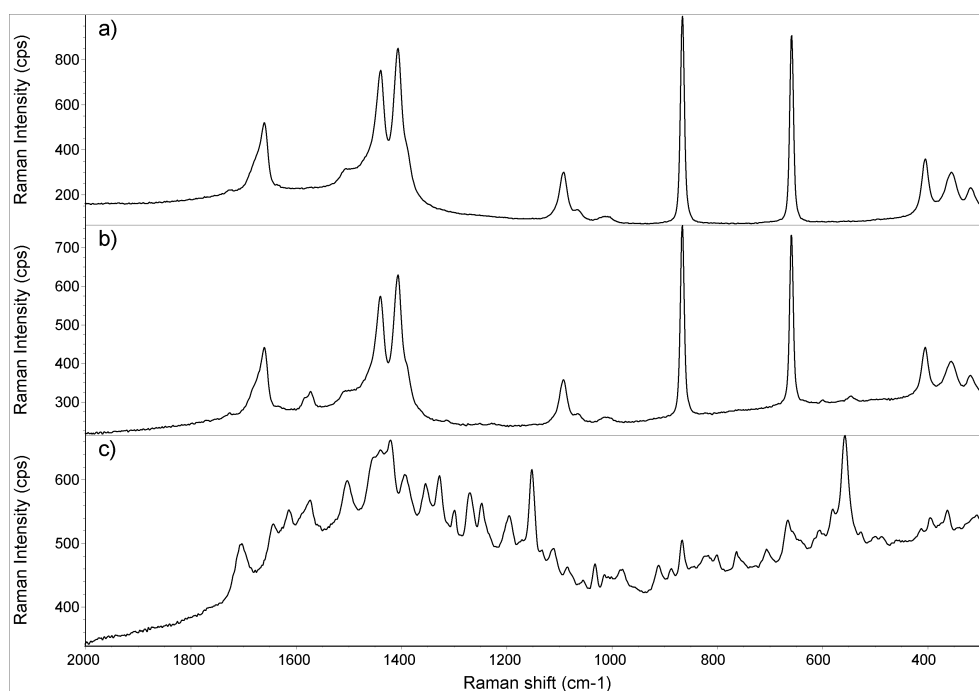
Obr. 13 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.



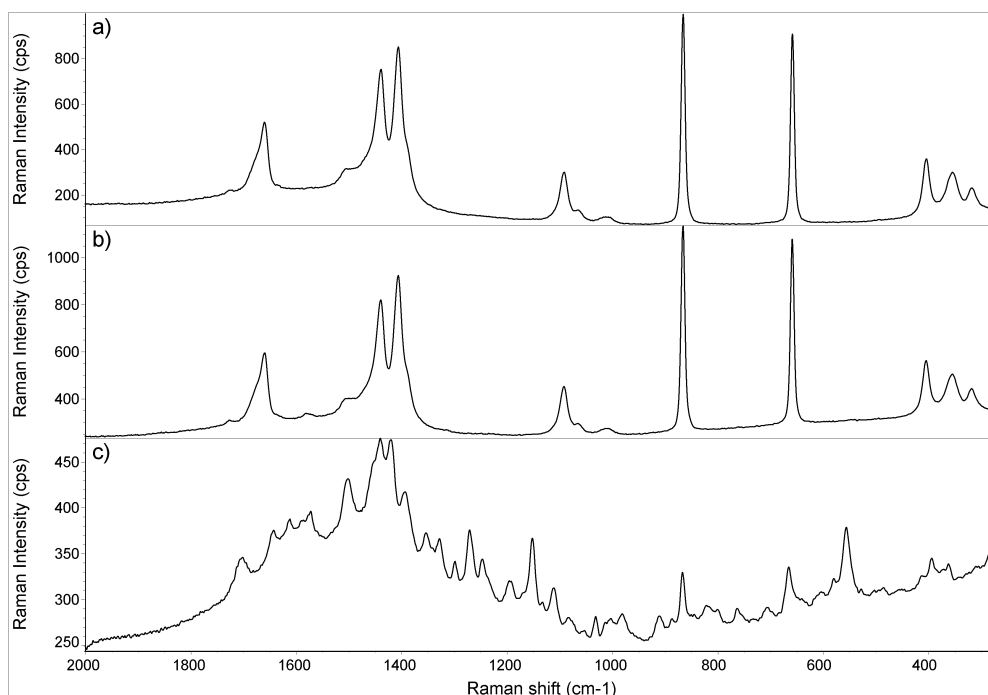
Obr. 14 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.



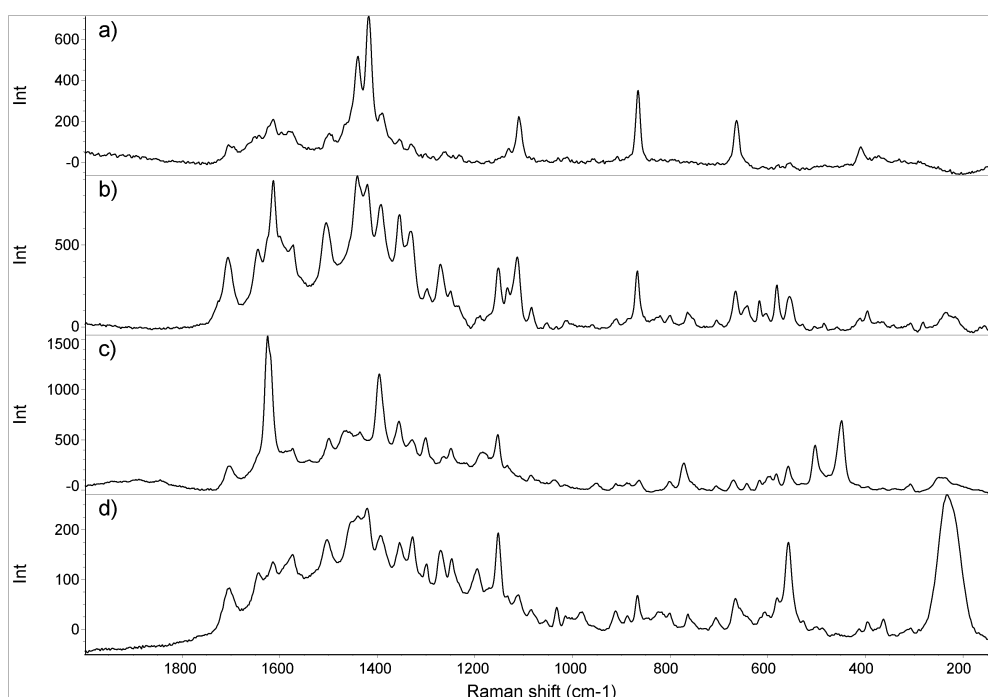
Obr. 15 Rezonanční Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 633 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) RRS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.



Obr. 16 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 780 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Rezonanční Ramanovo spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.



Obr. 17 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu (excitace 780 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum roztoku indiga v *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ c) SERS spektrum tohoto roztoku.



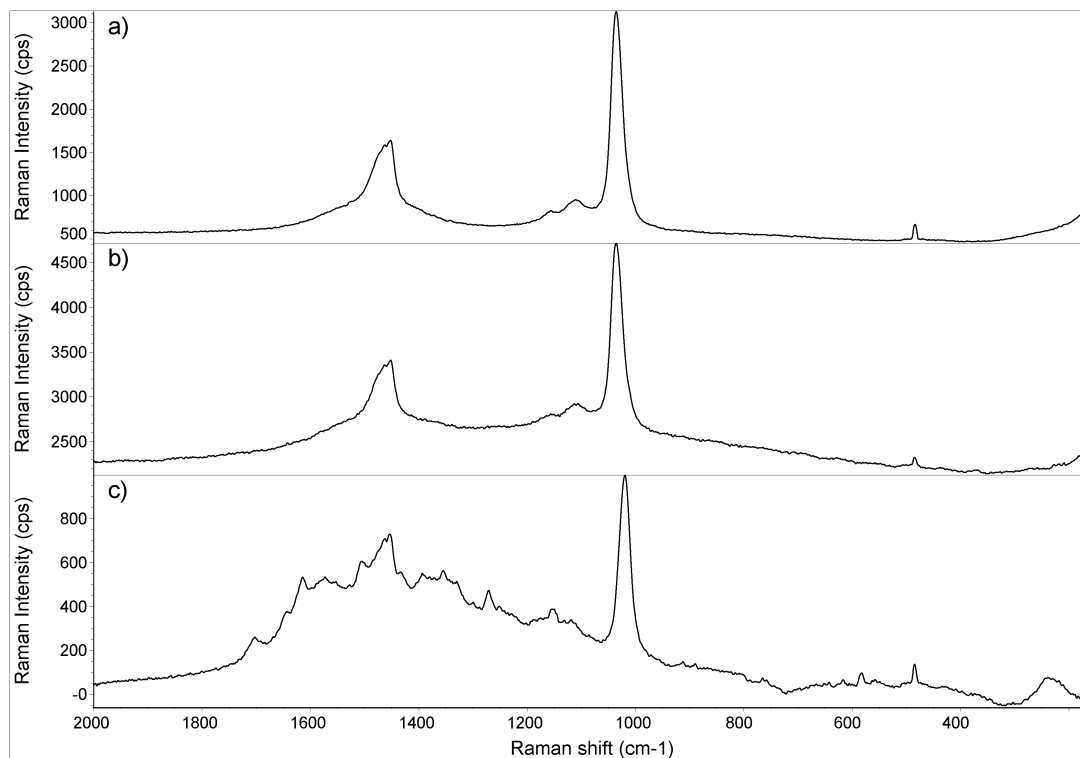
Obr. 18 Porovnání relativních intenzit povrchově zesílených pásů indiga v roztoku *N,N*-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při čtyřech excitačních vlnových délkách. a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm. Pozadí bylo softwarově upraveno.

Tabulka 2 Pozorovaná maxima v SERS a SERRS spektrech indiga.(roztoky v N,N-dimethylformamidu o koncentraci $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) při různých excitačních vlnových délkách.

Vlnová délka excitačního laseru			
445 nm	532 nm	633 nm	780 nm
	235 w		233 vs
		250 m	
		448 s	
		503 s	
	555 m	558 m	557 s
	581 m	584 w	581 m
		595 w	
			606 w
	617 m	617 w	
	642 w	640 w	
		705 w	706 m
	764 w		763 m
		772 m	
		802 w	801 w
			824 w
			887 w
			912 m
		948 w	
			980 m
		1039 w	1032 m
1110 m	1113 m		1111 m
	1152 m	1153 m	1152 s
		1184 m	1195 m
		1249 m	1248 m
1260 w			
	1271 m		1270m
	1298 m	1301 m	1299 m
1331 w	1331 s	1329 m	1328 s
1355 w	1355 s	1356 m	1354 m
1390 m	1393 s	1396 s	1394 m
		1464 m	
1499 w	1505 s	1499 m	1503 m
	1573 s		1574 m
1613 m	1613 vs	1625 vs	1614 m
	1645 s		1644 m
1705 w	1706 m	1702 m	1703 s

Měření indiga v roztoku methanolu

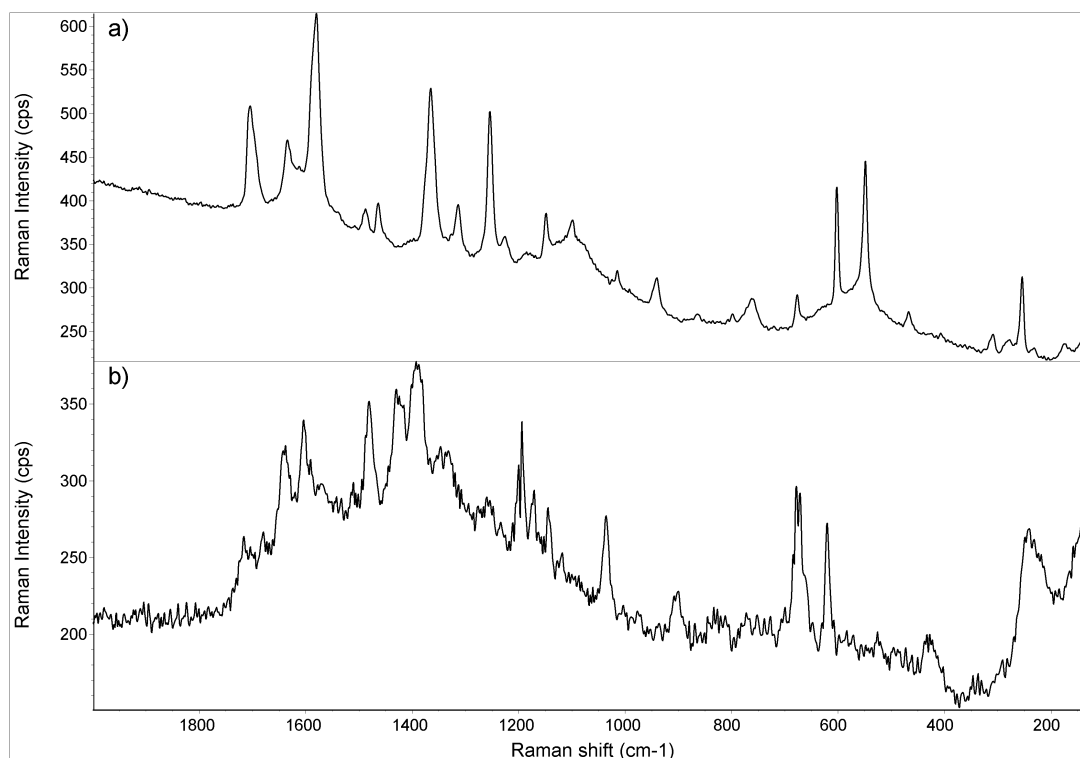
Dále bylo provedeno i měření indiga v roztoku methanolu při vybrané excitační vlnové délce 532 nm. Kvůli špatné rozpustnosti indiga v methanolu a tudíž jeho nízké koncentraci v roztoku není možné indigo identifikovat pomocí klasického Ramanova měření. V zesílených spektrech bylo již možné rozpoznat některé pásy indiga v oblasti 1150 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} (obr. 19).



Obr. 19 Ramanovo a SERS spektrum roztoku indiga v methanolu (excitace 532 nm).
a) Ramanovo spektrum methanolu b) Ramanovo spektrum roztoku indiga v methanolu
c) SERS spektrum roztoku indiga v methanolu.

Měření čistého práškového indiga

Dále bylo přistoupeno k měření SERS/SERRS spekter práškového indiga. Zde až na spektra získaná při excitaci 532 nm a 633 nm nebyl efekt povrchového zesílení tak zjevný. Při excitaci laserem vlnové délky 445 nm došlo dokonce po aplikaci Ag-disperze ke zhoršení celého záznamu a pásy indiga již nebyly ve spektru vůbec rozeznatelné. Při excitační vlnové délce 532 nm (obr. 20) došlo díky interakci indiga s nanočásticemi stříbra k výrazné změně spektrálních projevů indiga zejména v oblasti vlnočtů 1100 cm^{-1} až 1705 cm^{-1} . Nastala zde zejména změna relativních intenzit hlavních pásů indiga (1705 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} , 548 cm^{-1}). Při porovnání SERS spektra práškového indiga a SERS spektra indiga v roztoku



Obr. 20 Ramanovo a SERS spektrum čistého práškového indiga (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum práškového indiga b) SERS spektrum práškového indiga.

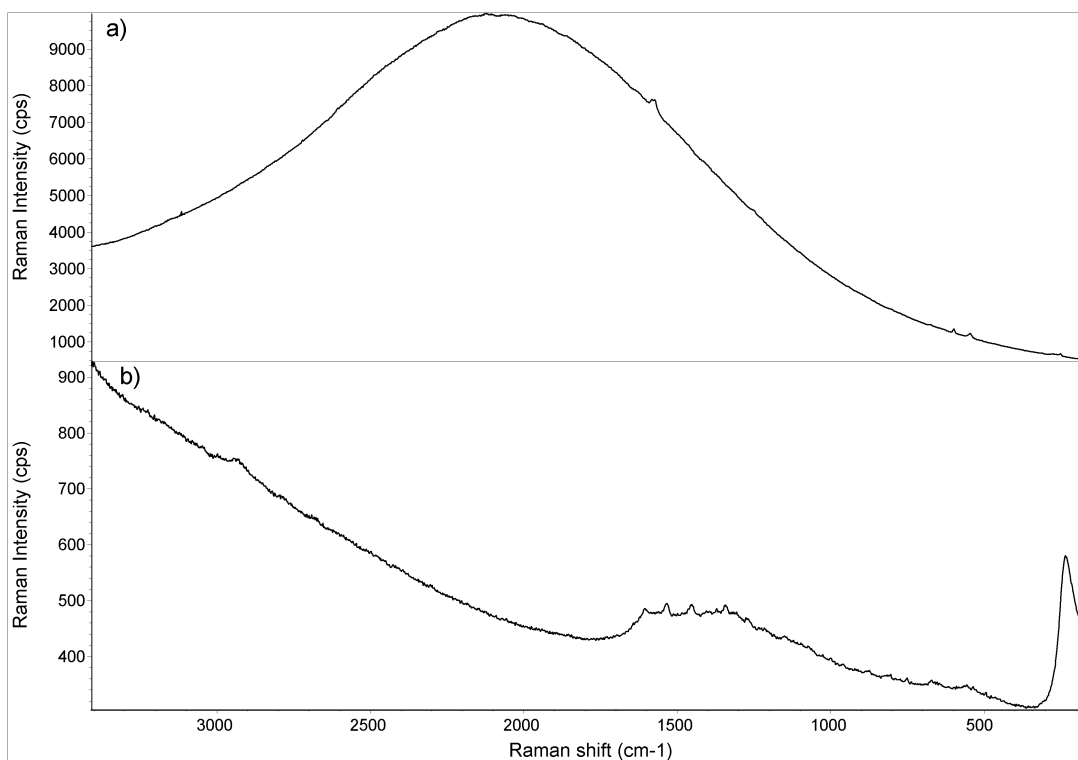
N,N-dimethylformamidu (obr. 13) se spektra shodovala zejména v oblasti 1260 cm^{-1} a 1640 cm^{-1}

Při excitaci 633 nm došlo po přidání Ag-disperze ke zjevnému potlačení fluorescence v získaném SERRS spektru (viz obr. 21). V oblasti vlnočtů 1200 cm^{-1} až 1600 cm^{-1} se objevila skupina zesílených pásů. Při excitaci 780 nm se Ramanova spektra čistého práškového indiga a SERS spektra tohoto vzorku mezi sebou nelišila polohou pásů, ani jejich intenzitami.

Je zde ovšem nutné zdůraznit, že měření v pevných vzorcích bylo v některých případech komplikováno nárůstem krystalů chloridu sodného (viz obr. 22), který je součástí Ag-disperze jako agregační činidlo. Tyto krystaly mnohdy překryly měřené místo ve vzorku a znemožnily tak získání spektra.

Měření modelové nátěrové vrstvy

Po zpracování výsledků měření čistého práškového indiga byl učiněn pokus o identifikaci indiga v modelové nátěrové vrstvě o koncentraci indiga 1%. Obecně lze konstatovat, že při excitačních vlnových délkách 445 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm nebyly pozorovány žádné efekty zesílení. Jedinou pozorovanou změnou byl posun

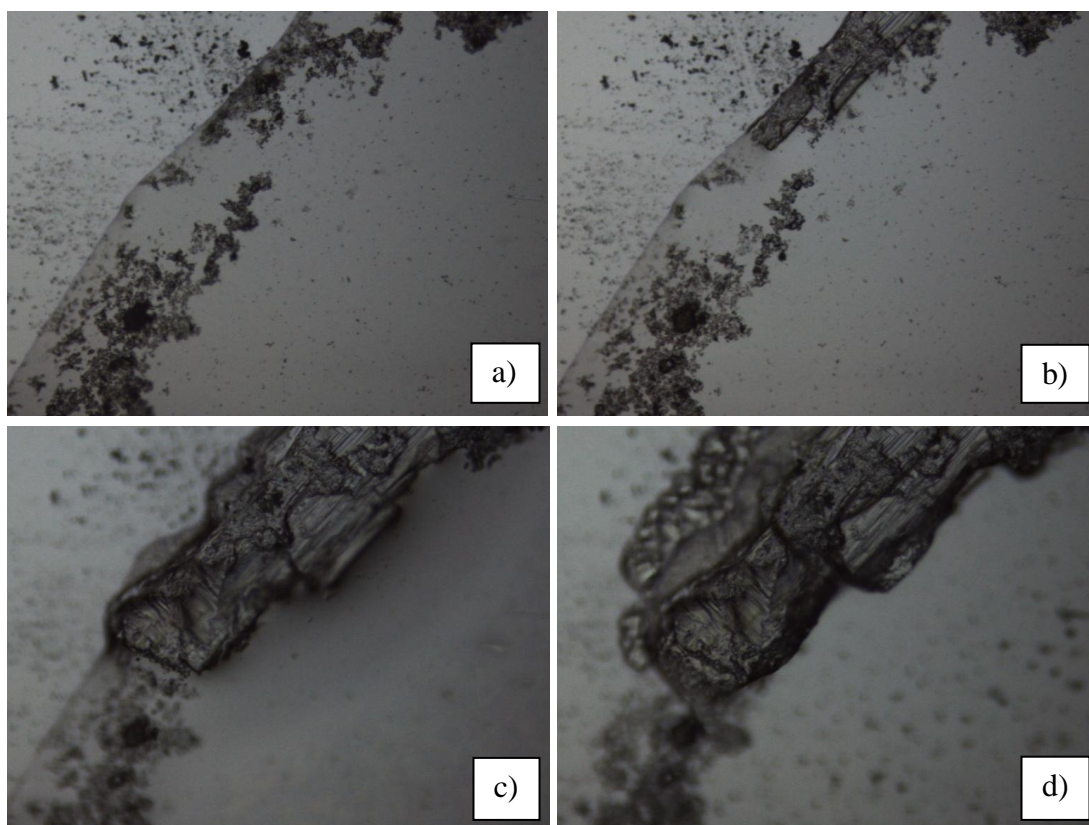


Obr. 21 Rezonanční Ramanovo a SERRS spektrum čistého práškového indiga (excitace 633 nm). a) RRS spektrum čistého indiga b) SERRS spektrum čistého indiga.

maxima fluorescence z 1800 cm^{-1} na 1950 cm^{-1} při excitaci 633 nm.

Měření indiga po přidání kyseliny sírové

Další měření byla prováděna s kyselinou sírovou. Jak již bylo zmíněno dříve, indigo lze převést pomocí této kyseliny na lépe rozpustné sulfonované indigo. Ve spektru samotné kyseliny sírové se její pásy objevují v oblasti kolem 550 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} . Ve spektrech při excitaci 445 nm, 532 nm a 633 nm lze po přidání koncentrované kyseliny sírové k práškovému indigu obecně pozorovat vznik intenzivních pásů v oblasti 1050 cm^{-1} až 1200 cm^{-1} (viz obr. 23, 24 a 25). Tyto pásy jsou pozůstatkem po přidání kyselině sírové. Ve spektru při excitaci 532 nm nejsou ale pásy v oblasti 1050 cm^{-1} až 1200 cm^{-1} tolik rozlišeny. Při excitaci 780 nm nejsou již pásy v těchto oblastech tak výrazné (viz Obr. 26). V oblasti 1250 cm^{-1} až 1600 cm^{-1} se v tomto spektru (excitace 780 nm) objevuje fluorescence. Oblast pásů 1250 cm^{-1} až 1750 cm^{-1} ve spektrech při excitaci 445 nm, 532 nm a 633 nm odpovídá pásům sulfonovaného indiga uvedeným v publikacích [38,40].



Obr. 22 *Růst krystalů chloridu sodného v kapce Ag-disperze v závislosti na čase. a) 0 min. od nanesení Ag-disperze b) 18 min. od nanesení Ag-disperze c) 30 min. od nanesení Ag-disperze d) 38 min. od nanesení Ag-disperze.*

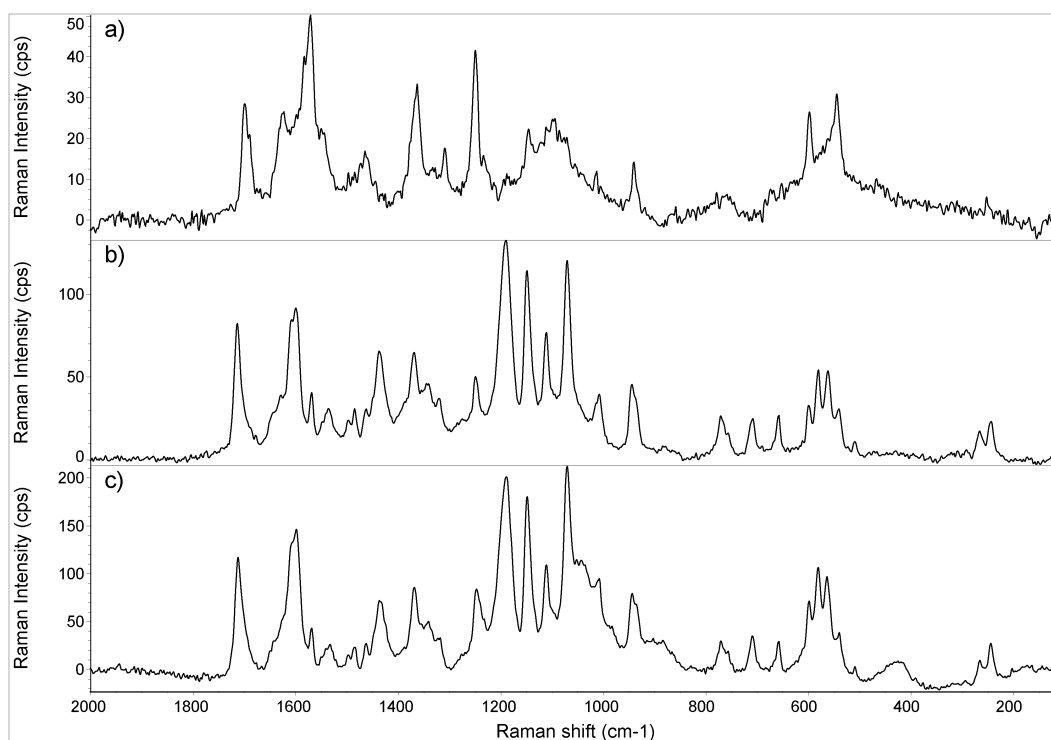
Nejkvalitnější spektrum bylo naměřeno při excitaci 445 nm díky existenci rezonančního zesílení (viz obr. 23).

Po aplikaci Ag-disperze nebyla ve spektru při žádné z použitých excitačních vlnových délek pozorována změna v poloze pásů. Ramanova spektra i spektra měřená po aplikaci Ag-disperze se shodovala. Tato pozorování jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky [40]. Ze získaných výsledků je patrné, že po aplikaci Ag-disperze na vzorek došlo jen k minimálnímu zesílení. Toto může být způsobeno extrémně nízkým pH po přidání konc. kyseliny sírové, které může negativně ovlivnit interakci sulfonovaného indiga se stříbrnými nanočásticemi. Je zde ale nutné připomenout, že Ramanova spektra byla získána z povrchu modrého zrna indiga, zatímco spektra měřená po aplikaci Ag-disperze byla získána ze shluku stříbrných částic v roztoku.

Nejkvalitnější záznam byl opět získán při excitaci 445 nm, kde můžeme uvažovat současně o rezonančním i povrchovém zesílení. Pro úplnost bylo provedeno detailní odečtení všech Ramanových pásů získaných po přidání koncentrované kys. sírové k pevnému indigu při čtyřech excitačních vlnových délkách (viz tab. 3).

Měření indiga ve vzorku odebraném z modelové nátěrové vrstvy po přidání kyseliny sírové

Protože byly výsledky měření s kyselinou sírovou zajímavé, byl proveden také pokus o získání spekter sulfonovaného indiga ve vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy po přidání kyseliny sírové. Toto měření bylo uskutečněno pouze při excitační vlnové délce 532 nm, protože při této excitační vlnové délce měření nejméně komplikovala fluorescence. Přesto byly i v tomto případě projevy indiga po přidání kyseliny sírové překryty fluorescencí (viz obr. 27). Po aplikaci Ag-disperze byla tato fluorescence úspěšně potlačena. Získané spektrum se shodovalo s dříve získaným SERS spektrem indiga po přidání kyseliny sírové (viz str. 33).



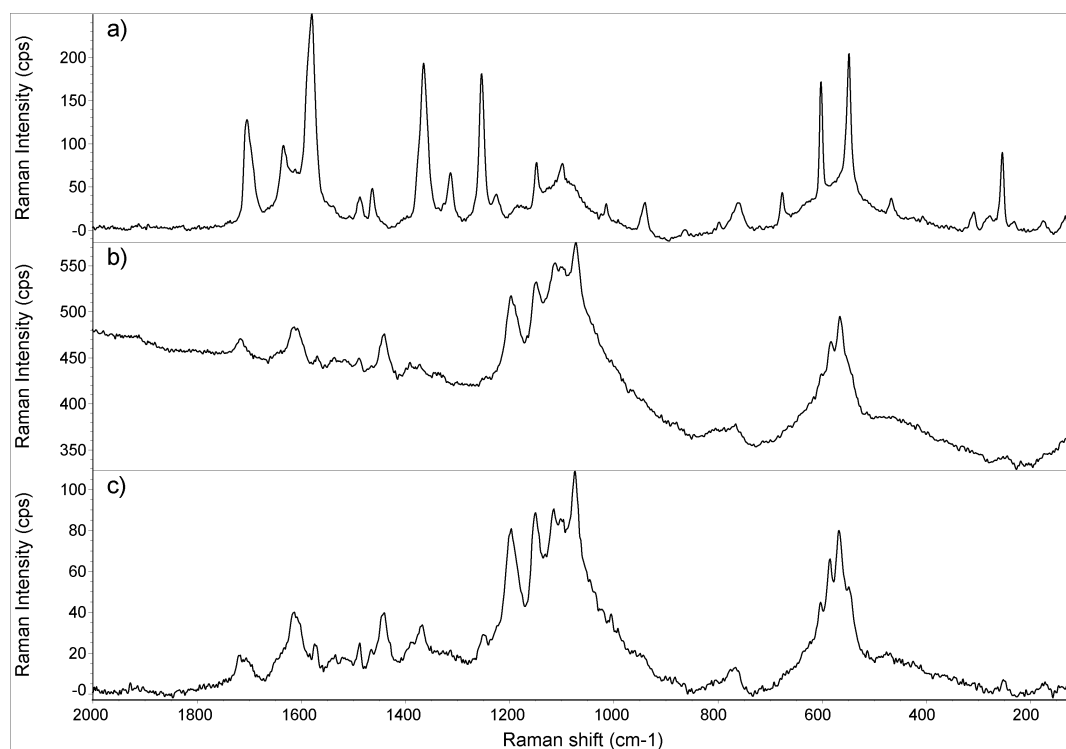
Obr. 23 *Rezonanční Ramanovo a SERS spektrum práškového indiga po přidání kyseliny sírové (excitace 445 nm). a) Ramanovo spektrum čistého práškového indiga b) RRS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové c) SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové.*

Měření mikro vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného N,N-dimethylformamidem

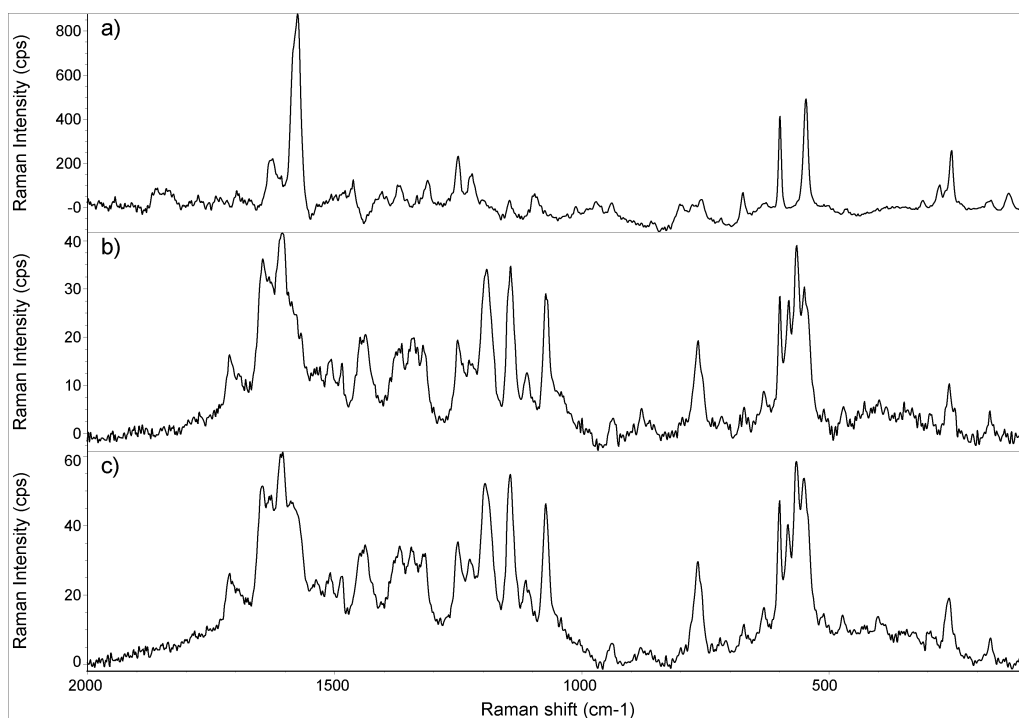
Pokusy o měření SERS spekter indiga byly zakončeny měřením vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy a extrahovaného N,N-dimethylformamidem. Spektra byla proměřena při excitačních vlnových délkách 532 nm a 633 nm. Z obr. 28 je patrné, že po extrakci indiga z modelové nátěrové vrstvy je možné tuto látku ve spektru

identifikovat (především pás o vlnočtu přibližně 1570 cm^{-1}). K zesílení po aplikaci Ag-disperze dochází na první pohled jen v malé míře (oblast vlnočtů 1500 cm^{-1} až 1700 cm^{-1}). Pokud jsou ale pásy rozpouštědla použity jako vnitřní standard, zesílení je dobře patrné.

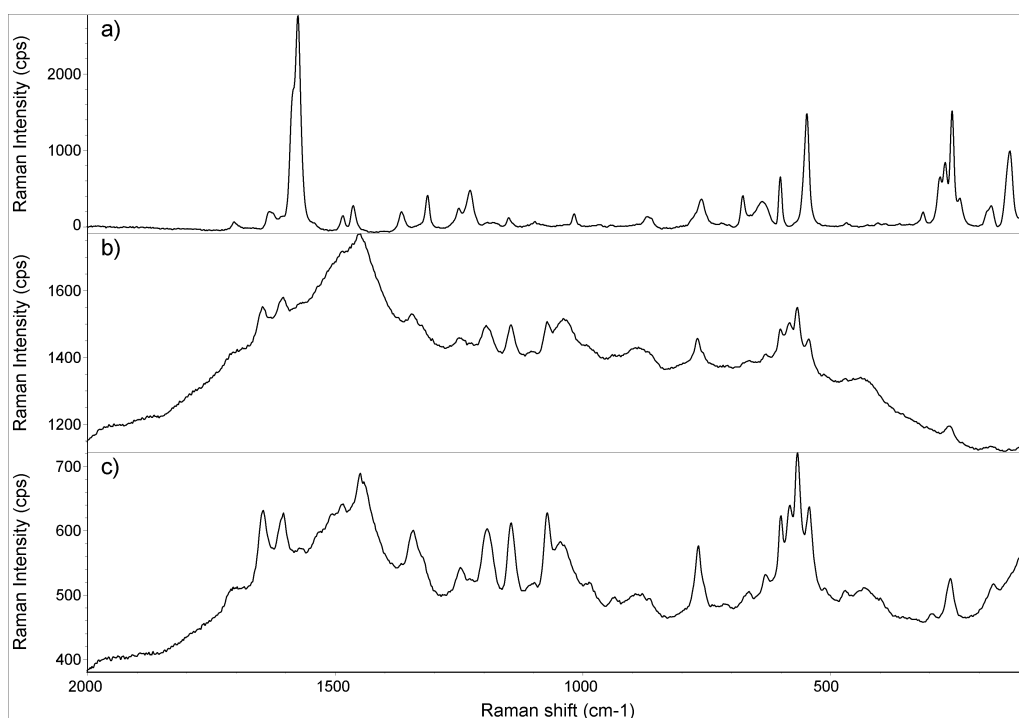
Při excitaci 633 nm byly veškeré spektrální projevy indiga maskovány fluorescencí (obr. 29), která byla po aplikaci Ag-disperze potlačena a indigo bylo možné identifikovat.



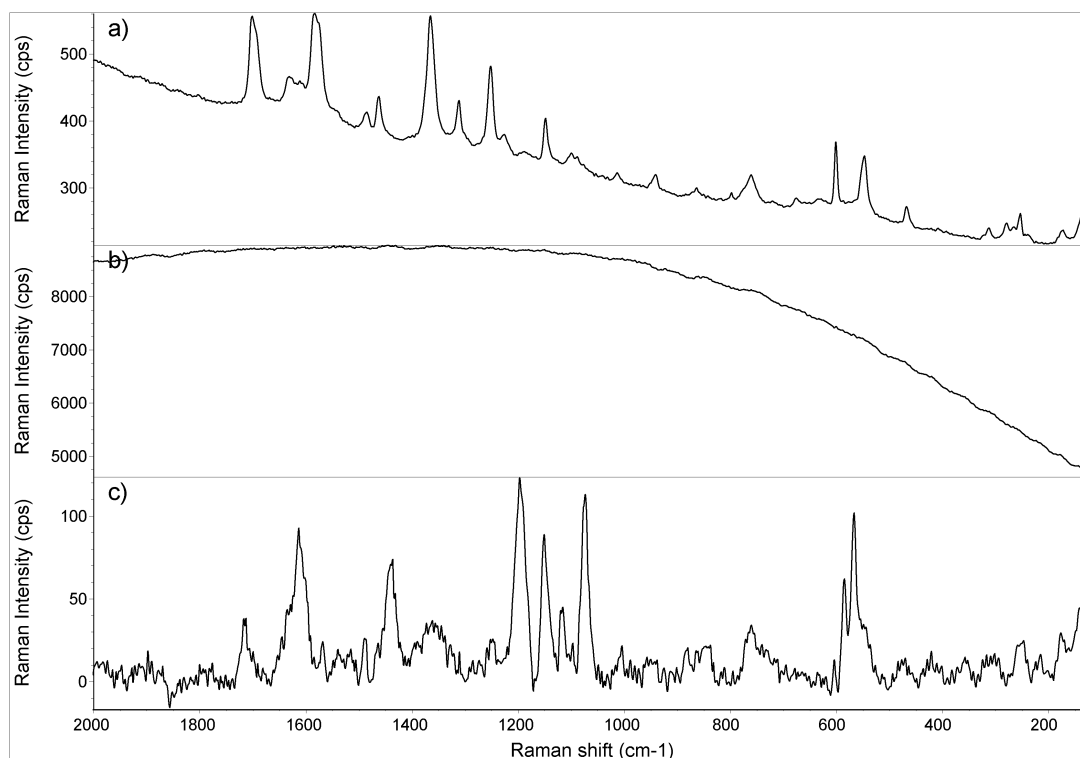
Obr. 24 Ramanovo a SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum čistého práškového indiga b) Ramanovo spektrum indiga po přidání kyseliny sírové c) SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové.



Obr. 25 Ramanovo a SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové (excitace 633 nm). a) Ramanovo spektrum čistého práškového indiga b) Ramanovo spektrum indiga po přidání kyseliny sírové c) SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové.



Obr. 26 Ramanovo a SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové (excitace 780 nm). a) Ramanovo spektrum čistého práškového indiga b) Ramanovo spektrum indiga po přidání kyseliny sírové c) SERS spektrum indiga po přidání kyseliny sírové.

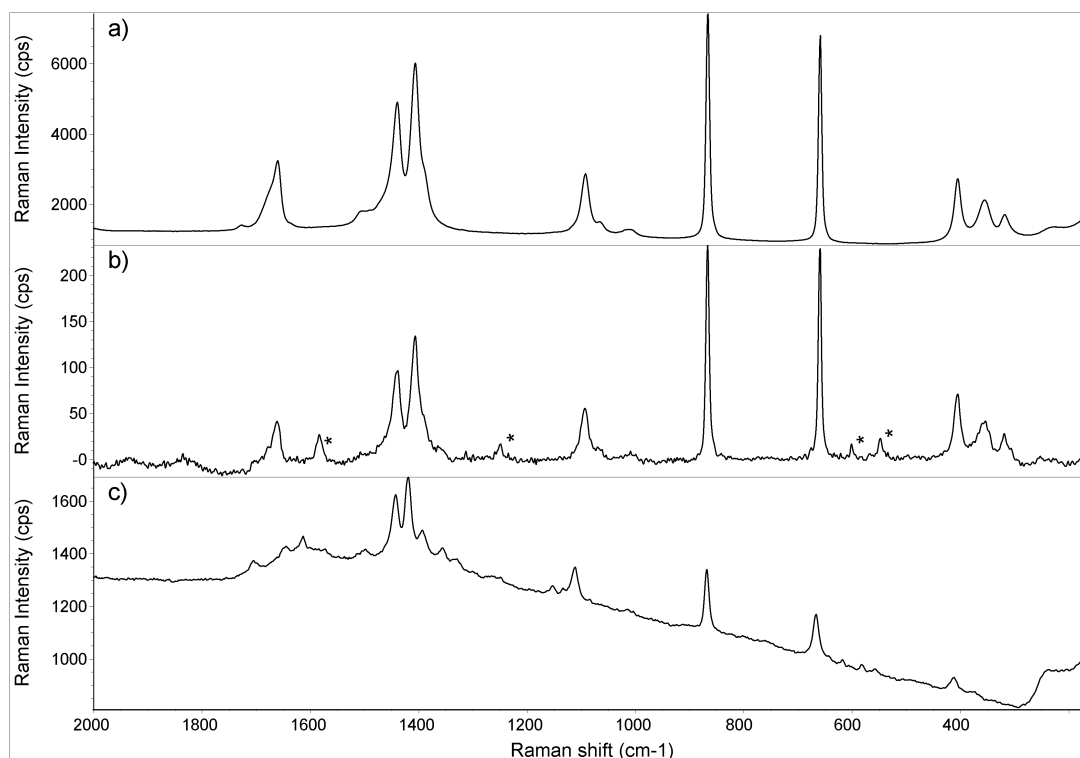


Obr. 27 Ramanovo a SERS spektrum vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy po přidání kyseliny sírové (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum vzorku odebraného z modelové nátěrové vrstvy b) Ramanovo spektrum tohoto vzorku s přidavkem kyseliny sírové c) softwarově upravené SERS spektrum tohoto vzorku s přidavkem kyseliny sírové.

Ze spekter roztoků indiga v N,N-dimethylformamidu je zjevné, že k zesílení dochází. I v tomto případě má ale na kvalitu spektra velký vliv zvolená excitační vlnová délka, spojená zejména s povrchovým i rezonančním zesílením při excitaci 633 nm. V roztoku indiga v methanolu bylo sice zesílení pozorováno, ale je nutné brát v potaz nedostatečnou rozpustnost tohoto pigmentu.

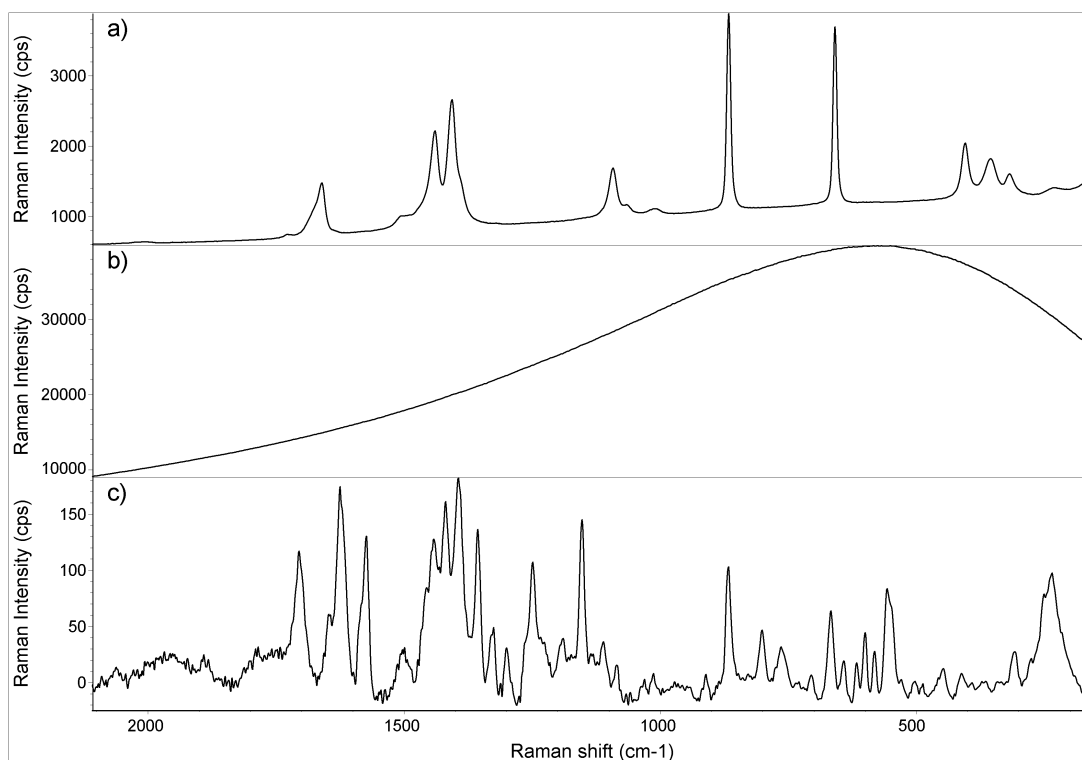
Při pokusu o získání SERS a SERRS spekter práškového indiga a indiga v modelové nátěrové vrstvě nebyl zesilující efekt tak intenzivní jak bylo očekáváno. K patrné interakci indiga s Ag-disperzí, která má zásadní vliv na spektrální projevy tohoto pigmentu, došlo jen u práškového indiga při excitaci 532 nm a při 633 nm. Je tedy zřejmé, že pouhá aplikace Ag-disperze na pevný vzorek není u indiga všeobecně přínosná.

V případě, že není možné v modelové nátěrové vrstvě vizuálně najít částici indiga, která by byla měřena nebo získání spektra komplikuje fluorescence, je přínosné extrahovat indigo pomocí N,N-dimethylformamidu a měření povrchově zesílených spekter po aplikaci Ag-disperze provádět v roztoku.



Obr. 28 Ramanovo a SERS spektrum vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného *N,N*-dimethylformamidem (excitace 532 nm). a) Ramanovo spektrum *N,N*-dimethylformamidu b) Ramanovo spektrum vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného *N,N*-dimethylformamidem (pásky s hvězdičkou označují indigo) c) SERS spektrum tohoto vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného *N,N*-dimethylformamidem.

SERS spektra získaná po přidání kyseliny sírové k pevnému indigu obecně vykazují nižší úroveň zesílení. Při excitaci 445 nm bylo získané spektrum viditelně nejintenzivnější díky spolupůsobení povrchového a rezonančního zesílení.



Obr. 29 Rezonanční Ramanovo a SERRS spektrum vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného N,N-dimethylformamidem (excitace 633 nm). a) Ramanovo spektrum N,N-dimethylformamidu b) RRS spektrum vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného N,N-dimethylformamidem c) SERRS spektrum tohoto vzorku indiga odebraného z modelové nátěrové vrstvy extrahovaného N,N-dimethylformamidem při excitaci 633 nm.

Tabulka 3 Pozorovaná maxima v SERS a SERRS spektrech indiga po přidání konc. kyseliny sírové při čtyřech excitačních vlnových délkách.

Vlnová délka excitačního laseru			
445nm	532nm	633 nm	780 nm
244 w		256 m	257 w
266 w		470 w 550 s	
541 w			542 m
562 m	566 m	565 vs	567 m
580 m	583 m	581 s	583 m
600 w		599 s	598 m
658 w		632 w	631 w
709 w		672 w	
771 w	766 w	765 m	769 m
		879 w	888 w
		936 w	
944 m			
1008 m			1040 m
1071 vs	1073 vs	1073 s	1072 m
1111 m	1113 s	1111 m	
1149 vs	1149 s	1144 s	1146 m
1190 vs	1198 s	1193 s	1196 m
		1227 m	
1250 m		1251 m	1251 w
1321 w		1321 m	
1345 m		1340 m	1343 w
1369 m		1364 m	
	1392 w		
1437 m	1441 m	1438 m	1450 s
1485 w	1490 w	1485 m 1507 m	
1536 m	1537 w		
1569 w	1570 w		
1600 s		1607 vs	1605 w
	1614 m		
		1646 s	1647 w
1714 s	1718 w	1713 m	

5. Závěr

V souladu s vytyčeným cílem bakalářské práce - tj. identifikací indiga v nátěrových vrstvách výtvarných děl - byly detailně studovány modelové vzorky s využitím škály technik mikro-Ramanovy spektroskopie v široké oblasti excitačních vlnových délek.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že v případech kdy je možné zrna pigmentu v pevných vzorcích vizuálně lokalizovat zcela postačuje k jejich identifikaci klasická mikro-Ramanova spektroskopie. Velký vliv na kvalitu získaného záznamu (z hlediska celkového charakteru spektra, ale i relativních intenzit pásů) má použitá excitační vlnová délka.

V případech kdy zrna indiga nejsou vizuálně rozlišitelná a také v případě silně fluoreskujících vzorků je vhodné přejít k technikám povrchově zesíleným. Přímá aplikace nanočástic stříbra na pevné vzorky se u tohoto pigmentu ukázala jako prakticky málo použitelná. Jako nejefektivnější se tedy jeví extrakce indiga do vhodného rozpouštědla (např. N,N-dimethylformamidu) následovaná přidáním disperze nanočástic stříbra. I v tomto případě hraje klíčovou úlohu excitační vlnová délka - v některých případech je možné získat Ramanovo spektrum i před přidáním nanočástic stříbra. Povrchově zesílená spektra roztoku indiga bylo možné získat pro všechny excitační vlnové délky, přičemž nejlepšího výsledku bylo dosaženo při excitaci 633 nm díky kombinaci povrchového a rezonančního zesílení.

Určitou alternativou pro identifikaci indiga s využitím povrchově zesílených metod Ramanovy spektroskopie je převedení pigmentu do roztoku působením koncentrované kyseliny sírové a následným stanovením sulfonovaného indiga. Nejlepších výsledků bylo i v tomto případě dosaženo díky kombinaci povrchového a rezonančního zesílení (excitace při 445 nm).

Důležitým výsledkem bakalářské práce je i závěr, že vzhledem k značně komplikovanému mechanismu interakce indiga se stříbrnými nanočásticemi je pro praktické analytické využití povrchově zesíleného Ramanova rozptylu vždy nezbytné předběžné spektrální studium modelových vzorků v závislosti na způsobu získávání zesilujících nanočástic.

6. Literatura

- [1] Bell, I. M.; Clark, R. J. H.; Gibbs, P. J.: Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (pre- \approx 1850 AD). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53**, 2159-2179 (1997).
- [2] Scherrer, N. C.; Zumbuehl, S.; Delavy, F.; Fritsch, A.; Kuehnen, R.: Synthetic Organic Pigments of the 20th and 21st Century Relevant to Artist's Paints: Raman Spectra Reference Collection. *Spectrochimica Acta, Part A* **73**, 505-524 (2009).
- [3] Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J.: Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**: 2, 163-166 (1974).
- [4] Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P.: Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **84**, 1-20 (1977).
- [5] Albrecht, M. G.; Creighton, J. A.: Anomalous intense Raman- spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of American Chemical Society* **99**: 15, 5212-5217 (1977).
- [6] RNDr. Kvítek, L., CSc.: Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra. Olomouc, 2008. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- [7] Oakley, L. H.; Fabian, D. M.; Mayhew, H. E.; Svoboda, S. A.; Wustholz, K. L.: Pretreatment Strategies for SERS Analysis of Indigo and Prussian Blue in Aged Painted Surfaces. *Analytical Chemistry* **84**, 8006-8012 (2012).
- [8] Chen, K.; Leona, M.; Vo-Dinh, T.: Surface-enhanced Raman scattering for identification of organic pigments and dyes in works of art and cultural heritage material. *Sensor Review* **27**, 109-120 (2007).
- [9] Lee, P. C.; Meisel, D.: Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Journal of Physical Chemistry* **86**, 3391-3395 (1982).
- [10] Yin, Y.; Li, Z.; Zhong, Z.; Gates, B.; Xia, Y.; Venkateswaran, S.: Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *Journal of Materials Chemistry* **12**, 522-527 (2002).
- [11] <<http://www.nicoletcz.cz/niccolloidsilver/>> [cit. 28. 4. 2013]
- [12] Clark R. J. H.: Raman microscopy as a structural and analytical tool in the fields of art and archaeology. *Journal of Molecular Structure* **834-836**, 74-80 (2007).

- [13] Brosseau, Ch. L.; Casadio, F.; Van Duyne, R. P.: Revealing the invisible: using surface-enhanced Raman spectroscopy to identify minute remnants of color in Winslow Homer's colorless skies. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**, 1305-1310 (2011).
- [14] Leona, M.; Stenger, J.; Ferloni, E.: Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art. *Journal of Raman Spectroscopy* **37**, 981-992 (2006).
- [15] Doherty, B.; Brunetti, B. G.; Sgamellotti, A.; Miliani, C.: A detachable SERS active cellulose film: a minimally invasive approach to the study of painting lakes. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**, 1932-1938 (2011).
- [16] Jurasekova, Z.; del Puerto, E.; Bruno, G.; García-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S.; Domingo, C.: Extractionless non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopic detection of historicalmordant dyes on textile fibers. *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 1455-1461 (2010).
- [17] Jurasekova, Z.; Domingo, C.; Garcia-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S.: In situ detection of flavonoids in weld-dyed wool and silk textiles by surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy* **39**, 1309-1312 (2008).
- [18] Brosseau, Ch. L.; Gambardella, A.; Casadio, F.; Grzywacz, C. M.; Wouters, J.; Van Duyne R. P.: Ad-hoc Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Methodologies for the Detection of Artist Dyestuffs: Thin Layer Chromatography-Surface Enhanced Raman Spectroscopy and in Situ On the Fiber Analysis. *Analytical Chemistry* **81**, 3056-3062 (2009).
- [19] Cañamares, M.V.; Garcia-Ramos, J.V.; Domingo, C.; Sanchez-Cortes, S.: Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid. *Vibrational Spectroscopy* **40**, 161-167 (2006).
- [20] Bruni, S.; Guglielmi, V.; Pozzi, F.: Historical organic dyes: a surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral database on Ag Lee–Meisel colloids aggregated by NaClO₄. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**, 1267-1281 (2011).
- [21] Cañamares, M. V.; Lombardi, J. R.; Leona, M.: Surface-enhanced Raman scattering of protoberberine alkaloids. *Journal of Raman Spectroscopy* **39**, 1907-1914 (2008).
- [22] FitzHugh, E. W. (Edit.): *Artists' pigments: a handbook of their history and characteristics* (Vol. 3). Oxford, Oxford University Press 1997.
- [23] Wolk, J. L.; Frimer, A. A.: Preparation of Tyrian Purple (6,6'-Dibromoindigo): Past and Present. *Molecules* **15**, 5473-5508 (2010).

- [24] Amat, A.; Rosi, F.; Miliani, C.; Sgamellotti, A.; Fantacci, S.: Theoretical and experimental investigation on the spectroscopic properties of indigo dye. *Journal of Molecular Structure* **993**, 43-51 (2011).
- [25] Correa, H.S.; Ortiz, E.; Uc, V. H.; Quintal, I. D. B.; Avila, J. L. H.: Indigo stability: an ab initio study. *Molecular Simulation* **37**, 1085-1090 (2011).
- [26] <http://www.naturalpigments.com/detail.asp?PRODUCT_ID=415-11B> [cit. 22. 4. 2013]
- [27] Bruni, S.; Guglielmi, V.; Pozzi, F.: Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) on silver colloids for the identification of ancient textile dyes: Tyrian purple and madder. *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 175-180 (2010).
- [28] Robb, M. J.; Ku, S.; Brunetti, F. G.; Hawker, C. J.: A Renaissance of Color: New Structures and Building Blocks for Organic Electronics. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **51**, 1263-1271 (2013).
- [29] Rondão, R.; de Melo, J. S. S.: Thio-Mayan-like Compounds: Excited State Characterization of Indigo Sulfur Derivatives in Solution and Incorporated in Palygorskite and Sepiolite Clays. *Journal of Physical Chemistry C* **117**, 603-614 (2013).
- [30] Kučková, S.; Němec, I.; Hynek, R.; Hradilová, J.; Grygar, T.: Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**, 275-282 (2005).
- [31] Ribechini, E; Perez-Arantegui, J.; Colombini, M. P.: Positive and negative-mode laser desorption/ionization-mass spectrometry (LDI-MS) for the detection of indigoids in archaeological purple. *Journal of Mass Spectrometry* **48**, 384-391 (2013).
- [32] Karapanagiotis, I.; de Villemereuil, V.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Vougianniopoulou, K.; Skaltsounis, A. L.: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **29**, 1491-1502 (2006).
- [33] Tomkinson, J.; Bacci, M.; Picollo, M.; Colognesi, D.: The vibrational spectroscopy of indigo: A reassessment. *Vibrational Spectroscopy* **50**, 268-276 (2009).
- [34] Rondão, R.; de Melo, J. S. S.; Bonifácio, V. D. B.; Melo, M. J.: Dehydroindigo, the Forgotten Indigo and Its Contribution to the Color of Maya Blue. *Journal of Physical Chemistry* **114**, 1699-1708 (2010).
- [35] Baran, A.; Fiedler, A.; Schulz, H.; Baranska, M.: *In situ* Raman and IR spectroscopic analysis of indigo dye. *Analytical Methods* **2**, 1372-1376 (2010)
- [36] Ajiki, H.; Pozzi, F.; Huang, L.; Massa, L.; Leona, M.; Lombardi, J. R.: Raman spectrum of monobromindigo. *Journal of Raman Spectroscopy* **43**, 520-525 (2012)

- [37] Fiedler, A.; Baranska, M.; Schulz, H.: FT-Raman spectroscopy - a rapid and reliable quantification protocol for the determination of natural indigo dye in *Polygonum tinctorium*. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**, 551-557 (2011).
- [38] Proietti, N.; Presciutti, F.; Di Tullio, V.; Doherty, B.; Marinelli, A. M.; Provinciali, B.; Macchioni, N.; Capitani, D.; Miliani, C.: Unilateral NMR, ¹³C CPMAS NMR spectroscopy and micro-analytical techniques for studying the materials and state of conservation of an ancient Egyptian wooden sarcophagus. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 3117–3131 (2011).
- [39] Shadi, I. T.; Chowdhry, B. Z.; Snowden, M. J.: Semi-quantitative analysis of indigo by surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 2213-2220 (2003)
- [40] Peica, N.; Kiefer, W.: Characterization of indigo carmine with surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids and island films, and theoretical calculations. *Journal of Raman Spectroscopy* **39**, 47-60 (2008).
- [41] Shadi, I. T.; Chowdhry, B. Z.; Snowden, M. J.; Withnall, R.: Analysis of the conversion of indigo into indigo carmine dye using SERRS. *Chemical Communication* **12**, 1436-1437 (2004)
- [42] Omnic 7.4.127, Thermo Nicolet Corporation Madison, WI, USA
- [43] Kučková, S.; Hynek, R.; Němec, I.; Kодиček, M.; Jehlička, J.: Critical comparison of spectrometric analyses of non-mineral blue dyes and pigments used in artworks. *Surface and Interface Analysis* **44**, 963-967 (2012)
- [44] Burgio, L.; Clark, R. J. H.: Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 1491–1521 (2001).
- [45] Benquerenc, M.; Mendes, N. F. C.; Castellucci, E.; Gaspar, V. M. F.; Gil, F. P. S. C.: Micro-Raman spectroscopy analysis of 16th century Portuguese Ferreirim Masters oil paintings. *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 2135–2143 (2009).
- [46] del Río, M. S.; Picquart, M.; Haro-Poniatowski, E.; van Elslande, E.; Uc, V. H.: On the Raman spectrum of Maya blue. *Journal of Raman Spectroscopy* **37**, 1046–1053 (2006).
- [47] Tatsch, E.; Schradert, B.: Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy of Indigoids. *Journal of Raman Spectroscopy* **26**, 467-473 (1995)

- [48] McQuillan, J.: The discovery of surface-enhanced Raman scattering. *Notes and Records of the Royal Society* **63**, 105-109 (2009).
- [49] Klyachkovskaya, E.; Strekal, N.; Motevich, I.; Vaschenko, S.; Harbachova, A.; Belkov, M.; Gaponenko, S.; Dais, Ch.; Sigg, H.; Stoica, T.; Grützmacher, D.: Enhanced Raman Scattering of Ultramarine on Au-coated Ge/Si-nanostructures. *Plasmonics* **6**, 413-418 (2011).
- [50] Doležel, R.: Povrchový plasmon jako biodetektor. Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [51] Strauch, B.; Vlčková, B.; Němec, I.: Infračervená a Ramanova spektroskopie na katedrách chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze - od historie k současnosti. *Chemické Listy*. **104**, 1210-1219 (2010).
- [52] <http://www.raman-scattering.eu/raman/texts/037_text_27.php#> [cit. 1. 4. 2013]
- [53] <<http://www.cem.msu.edu/~cem924sg/ChristineHicks.pdf>> [cit. 4. 3. 2013]
- [54] <<http://www.ijvs.com/volume4/edition2/section1.html#Feature>> [cit. 8. 4. 2013]
- [55] <<http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?312>> [cit. 15. 4. 2013]